

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Gordana Šelo

**UTJECAJ DODATKA SIRKA NA AKTIVNOST LAKAZE TIJEKOM
SUBMERZNOG UZGOJA *TRAMETES VERSICOLOR***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, studeni 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18.06.2014.
Mentor: doc. dr. sc. *Marina Tišma*

Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor* *Gordana Šelo, 203 – DI*

Sažetak:

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz skupine Basidiomycota. Proizvodi različite izvanstanične lignolitičke enzime koji se mogu koristiti u mnogobrojne svrhe. Poznata je po proizvodnji enzima lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze EC 1.10.3.2.) koji katalizira oksidaciju supstrata prijenosom elektrona i istovremenom redukcijom kisika u vodu. Lakaze pripadaju skupini metaloenzima i u svom katalitičkom centru sadrže više atoma bakra te djeluju na velik broj različitih supstrata.

Submerzni uzgoj gljiva bijelog truljenja u obliku micelijskih peleta obuhvaća proizvodnju većine komercijalno značajnih biotehnoloških produkata. Morfološke karakteristike micelijskih kultura uzgojenih u submerznim uvjetima predstavljaju jedan od ključnih bioprocesnih parametara. Osim uvjeta provedbe procesa i dostupnosti hranjivih tvari, na produktivnost enzima pri uzgoju gljiva bijelog truljenja značajno utječu različiti induktori na način da pospješuju proizvodnju enzima.

U ovom radu korištena su dva različita soja *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613). Uzgoj je proveden submeržno u obliku micelijskih peleta, pri čemu je istražen utjecaj početne koncentracije micelijskih peleta i koncentracije induktora (sirka) na aktivnost lakaze. U pokusima bez dodatka induktora koristeći soj *Trametes versicolor* TV-6 postignuta je maksimalna aktivnost lakaze 507 U dm^{-3} , dok je sa sojem *Trametes versicolor* AG 613 postignuta maksimalna aktivnost $256,04 \text{ U dm}^{-3}$. U pokusima sa sirkom koristeći soj *Trametes versicolor* AG 613, veća volumna aktivnost je postignuta pri višoj koncentraciji sirka (40 g dm^{-3}) i iznosila je $1096,78 \text{ U dm}^{-3}$ u odnosu na nižu koncentraciju sirka (20 g dm^{-3}) gdje je postignuta aktivnost $790,83 \text{ U dm}^{-3}$.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, lakaza, submerzna fermentacija, sirak

Rad sadrži: Slika: 25
Stranica: 52
Tablica : 4
Literarnih referenci: 47

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. izv. prof.dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić Kojić</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 19. studenog 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IX. held on June 18th, 2014.
Mentor: Marina Tišma, PhD, assistant prof.

Influence of millet addition on laccase activity during submerge cultivation of *Trametes versicolor*

Gordana Šelo, 203 – DI

Summary:

Trametes versicolor, a white-rot basidiomycetes, produces different extracellular lignolytic enzymes which can be applied in many application fields. *Trametes versicolor* is known as fungi that produce enzyme laccase. Laccases (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) catalyze substrate oxidation by electron transfer and simultaneous reduction of oxygen to water. These enzymes are multicopper oxidases and they have ability to oxidize a broad range of substrates.

Submerged cultivation of white rot fungi in the pellet growth form embraced the production of a majority of commercially important products of biotechnology. Morphological characteristics of mycelial submerged cultures represents one of the key bioprocess parameters. Productivity of enzymes during the submerged cultivation is highly influenced by different inducers, meaning that stimulate the production of enzymes.

Two different strains of microorganism *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613) are used in this thesis. The cultivation is carried out in the form of submerged mycelial pellets, whereby the effect of initial concentration of mycelial pellets and inducer (millet) concentration on the activity of laccase was investigated. In experiments without the addition of an inducer volume activity of laccase 507 U dm⁻³ was achieved using the strain *Trametes versicolor* TV-6 and 256.04 U dm⁻³ using the strain AG 613. In experiments with the addition of millet using the strain *Trametes versicolor* AG 613, higher volume activity (1096.78 U dm⁻³) was achieved at higher concentration of millet (40 g dm⁻³), while the smaller concentration of millet (20 g dm⁻³) resulted with volume activity 790.83 U dm⁻³.

Key words: *Trametes versicolor*, laccase, submerged fermentation, millet

Thesis contains: Figures: 25
Pages: 52
Tables: 4
References: 47

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Ivica Strelec, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Marina Tišma, PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. Mirela Planinić, PhD, associate prof. | member |
| 4. Ana Bucić Kojić, PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: November 19, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Tišmi na posvećenom vremenu, poticanju i brojnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala na pristupačnosti i strpljenju u svakom trenutku.

Izv. prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić zahvaljujem na korisnim savjetima i vremenu koje je odvojila za bilo kakva pitanja i pomoć te gospođi Jelki Babić na pomoći i strpljenju tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama na potpori i korisnim idejama.

Posebna zahvala mojim roditeljima i bratu na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studija.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Gljive bijelog truljenja	4
2.1.1. <i>Trametes versicolor</i>	6
2.1.2. Lakaze	7
2.2. Uzgoj mikroorganizama u obliku peleta	12
2.2.1. Submerzni uzgoj mikroorganizama	13
2.2.2. Mehanizmi rasta filamentoznih gljiva u submerznim uvjetima	14
2.2.3. Oblik i formiranje micelijskih peleta.....	15
2.2.4. Rast peleta.....	16
2.2.5. Fragmentacija i raspad peleta	17
2.2.6. Karakterizacija reoloških svojstava smjese.....	17
2.2.7. Morfolologija micelija i proizvodnja metabolita	18
2.2.8. Dizajn bioprocesa s obzirom na morfološke karakteristike	20
2.3. Reološka svojstva fermentacijske smjese	20
2.3.1. Miješanje i aeracija.....	21
2.3.2. Utjecaj induktora na proizvodnju lakaze	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. Zadatak.....	24
3.2. Materijali i metode.....	24
3.2.1. Mikroorganizam	24
3.2.2. Kemikalije	24
3.2.3. Aparatura.....	25
3.2.4. Uzgoj i čuvanje kulture	27
3.2.5. Priprema tekuće hranjive podloge za uzgoj inokuluma	28
3.2.6. Priprema hranjive podloge za proizvodnju enzima.....	28
3.3. Analitičke metode	29
3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze.....	29
3.3.2. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom	30
3.3.3. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH	31
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. Proizvodnja enzima.....	33

4.1.1. Utjecaj početne koncentracije biomase na proizvodnju lakaze iz <i>Trametes versicolor</i> TV-6	33
4.1.2. Utjecaj početne koncentracije biomase na proizvodnju lakaze iz <i>Trametes versicolor</i> AG 613	36
4.1.3. Utjecaj dodatka sirka na proizvodnju lakaze iz gljive <i>Trametes versicolor</i> AG 613	39
4.1.4. Ovisnost aktivnosti lakaze o pH.....	44
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	48

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

c	množinska koncentracija tvari (mM)
d	promjer kivete (cm)
n	broj okretaja (okr min ⁻¹)
$S.A.$	specifična aktivnost enzima (U mg ⁻¹)
T	temperatura (°C)
t	vrijeme (dan)
$V.A.$	volumna aktivnost enzima (U dm ⁻³)
V_E	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm ³)
V_r	ukupni volumen uzorka u kivetu (cm ³)
γ_E	masena koncentracija enzima (mg dm ⁻³)
$\gamma_{IND,0}$	početna koncentracija induktora (g dm ⁻³)
$\gamma_{X,0}$	početna koncentracija biomase (g dm ⁻³)
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (min ⁻¹)

KRATICE:

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
BSA	goveđi serumski albumin
CCBAS	Mikrobiološka zbirka bazidiomiceta, Prag, Republika Češka
EC	(Enzyme Classification) klasifikacija enzima
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
MZKI	Mikrobiološka zbirka Kemijskog instituta, Ljubljana, Slovenija

SmF	submerzna fermentacija
SSF	eng. <i>solid-state</i> fermentation ili fermentacija na čvrstim nosačima
U	međunarodna jedinica enzimske aktivnosti ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

SIMBOLI:

Δ	promjena
λ	valna duljina (nm)
ε	ekstincijski koeficijent ($\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

1.UVOD

U novije vrijeme sve više težimo ka upotrebi "čistijih" tehnologija odnosno ka upotrebi ekološki prihvatljivih i učinkovitih materijala i sirovina. Industrijski bioprocesi u kojima se koriste filamentozni mikroorganizmi, obuhvaćaju proizvodnju većine komercijalno značajnih biotehnoloških produkata, kako u količinskom smislu, tako i u smislu raznolikosti metabolita. To su uglavnom submerzni načini uzgoja mikroorganizama gdje posebni uvjeti uzgoja rezultiraju različitim morfološkim i fizikalno-kemijskim karakteristikama hifa, te se tako mogu razlikovati rast u obliku filamenata i rast u obliku peleta. S ekonomskog gledišta, morfologija peleta u industrijskim procesima ima prednost u odnosu na filamentozni oblik rasta.

Gljive bijelog truljenja izlučuju smjesu izvanstaničnih lignolitičkih enzima koji se mogu upotrijebiti u prehrambenoj industriji, industriji pulpe i papira te brojnim drugim industrijama. Učinkovito razgrađuju lignin i druge aromatske spojeve u spojeve manje molekularne mase. Njihovo djelovanje se temelji na razbijanju aromatske strukture složenog prirodnog polimera lignina koji okružuje celulozu u lignoceluloznim materijalima.

Jedni od najpoznatijih i najvažnijih biokatalizatora su lakaze, a najpoznatiji izvor lakaza su gljive, naročito gljive bijelog truljenja, primjerice *Trametes versicolor*, na kojoj je provedeno istraživanje u ovom radu. Lakaze su oksidaze koje kataliziraju oksidaciju supstrata prijenosom elektrona i istovremenom redukcijom kisika u vodu. Djeluju na širok spektar različitih supstrata. Uz pomoć kisika kataliziraju oksidaciju *o*-, *p*- difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina, nekih anorganskih iona, aromatskih amina i različitih nefenolnih spojeva, što im daje veliku biotehnološku važnost. Za katalitičko djelovanje im je potreban samo kisik iz zraka pri čemu kao jedini nusprodukt nastaje voda. Ekološka prihvatljivost i mogućnost kataliziranja velikog broja kemijskih reakcija čini lakaze zanimljivim i važnim biokatalizatorima za različita istraživanja i industrijsku primjenu.

Osim uvjeta provedbe procesa i dostupnosti hranjivih tvari, na produktivnost enzima pri uzgoju gljiva bijelog truljenja značajno utječu različiti induktori na način da pospješuju proizvodnju enzima. Kao induktor u ovom radu korištena je prosolika žitarica, sirak, čije je zrno po kemijskom sastavu slično kukuruzu. Korištena su dva različita soja *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613), a procesi uzgoja micelijskih peleta i proizvodnje enzima provedeni su submerzno.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Gljive bijelog truljenja

Mikroorganizmi (grč. *mikros* – malen; *organismos* – organizam) su organizmi mikroskopske veličine, najčešće premaleni da bi se vidjeli golim okom. Žive u svim dijelovima biosfere gdje je prisutna tekuća voda, uključujući vruće izvore, dna oceana, visoke dijelove atmosfere te duboke stjenovite predjele unutar zemljine kore (Nester i sur., 2004.). Osnovna karakteristika mikroorganizama je mala veličina njihovih stanica, na osnovu čega su podijeljeni u posebnu skupinu, odvojenu od biljaka i životinja. Na Zemlji se neprestano odvijaju procesi razgradnje i sinteze, a mikroorganizmi, kao razgrađivači, u tim procesima imaju jako važnu ulogu. Hranjive tvari koje se nalaze u tijelima uginulih biljaka i životinja prerađuju razgradnjom složenih sastavnih dijelova u jednostavne kemijske spojeve koje ponovo koriste fotosintetski organizmi. Upravo zbog toga, mikroorganizmi imaju odlučujuću ulogu u biogeokemijskom ciklusu u koji pritječu hranjive tvari (nutrijenti) iz prirodne mreže hrane (Duraković, 1996.).

Radi što boljeg razumijevanja odnosa mikroorganizama, njihove funkcije i aktivnosti, stvoren je sustav klasifikacije prema kojem se mikroorganizmi dijele u tri domene: Bacteria, Archea i Eucarya. Domenu Bacteria i Archea čine prokarioti, a domenu Eucarya eukarioti, podijeljeni na carstva. Taj sustav je 1990. godine predložio Carl R. Woese (Nester i sur., 2004.).

Gljive pripadaju carstvu Fungi ili Mycota, koje čine jednostanični i višestanični eukarioti. Uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama često zvanih mesnatim gljivama. Gljive su heterotrofni, nefotosintetski organizmi čije su stanice obavijene staničnom stijenkom sastavljenom od polisaharida hitina. Za većinu gljiva karakteristične su dugačke, vlaknaste stanice hife koje tvore isprepletenu masu nalik na tkivo, micelij. Mogu rasti na svim mjestima gdje postoji iskoristiv organski materijal, a najviše im odgovara tamnije, vlažno okruženje (Johnson, 1990.).

Većina gljiva su saprofiti tj. organizmi koji potrebne hranjive tvari dobivaju od organskih ostataka mrtvih organizama. Gljive su također kemoorganoheterotrofi jer koriste organski materijal kao izvor ugljika i energije. Mogu izlučivati hidrolitičke enzime koji razgrađuju supstrate prisutne u okolišu, zatim otopljene hranjive tvari apsorbiraju. Primarni

polisaharid koji pohranjuju je glikogen. Na osnovu tipa spora, morfologije hifa i spolnog ciklusa, gljive su raspoređene u pet taksonomskih skupina: Deuteromycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes i Oomycetes.

Razred Basidiomycotina sadrži gljive nazvane Basidiomycetes, poznate kao gljive klobučarke. To su gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive. Većina bazidiomiceta su saprofiti i razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin.

Gljive truljenja su najrasprostranjeniji razgrađivači drveta i mogu se podijeliti na gljive bijelog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive blagog truljenja. Gljive bijelog truljenja su eukariotski mikroorganizmi koji u prirodi rastu na trulom drveću i drvenom materijalu. Imaju sposobnost razgradnje biljnog polimera lignina i lignoceluloznih materijala, a uključuju razrede Basidiomycota i Ascomycota. Naziv gljive bijelog truljenja su dobile po tome što prilikom procesa razgradnje lignoceluloznog materijala, materijal ostaje bijelo obojen. Jedini su mikroorganizmi koji su razvili kompletan enzimatski sustav za razgradnju lignina. Iako razgrađuju lignin, ne mogu ga koristiti kao izvor ugljika za njihov rast i razvoj te im je potreban drugi izvor ugljika poput celuloze. Pridaje im se sve veća važnost te se velika pažnja usmjerava na njihovo istraživanje upravo zbog njihove sposobnosti da razgrađuju različite organske spojeve (Revankar i Lele, 2006.; Gadd, 2001.). Značajnu ulogu imaju u bioremedijaciji, jer enzimi koji sudjeluju u razgradnji drveta također sudjeluju u razgradnji različitih organskih onečišćujućih tvari prisutnih u prirodi, pri čemu se posebno ističe gljiva bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*, koja može razgraditi toksične i netopljive komponente učinkovitije od nekih drugih mikroorganizama (Gadd, 2001.; Singh, 2006.; Singh i sur., 2009.).

Lignin i celuloza su spojevi bogati ugljikom, a za ekološki ciklus važno je da se taj ugljik može iskoristiti (Johnson, 1990.). Gljive bijelog truljenja luče izvanstanične lignolitičke enzime koji mogu razoriti složenu strukturu lignina i na taj način doći do celuloze koju će potom koristiti kao izvor ugljika i energije za njihov rast i razvoj (Gadd, 2001.). Gljive bijelog truljenja napadaju lignin dok celulozu manje oštećuju i kao takve nazivaju se selektivni razlagači jer razgrađuju lignin, a vrijednu celulozu ostavljaju neoštećenom (Pilaš, 2009.).

Za razgradnju lignoceluloznih materijala važna je kombinacija izvanstaničnih lignolitičkih enzima lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze pa se prema proizvodnji navedenih enzima gljive bijelog truljenja mogu podijeliti u tri skupine (Lankinen, 2004):

- gljive koje proizvode LiP, MnP i lakazu
- gljive koje proizvode MnP i lakazu
- gljive koje proizvode LiP i lakazu

Gljive bijelog truljenja su vrlo otporni mikroorganizmi, podnose više temperature i širi raspon pH, a izvanstanični enzimi koje izlučuju omogućavaju im podnošenje nepogodnih i toksičnih uvjeta. Osim u bioremedijaciji, oksidativni enzimi gljiva bijelog truljenja mogu se upotrijebiti za izbjeljivanje pulpe drveta u proizvodnji papira ili tekstilnih boja (Gadd, 2001.; Teerapatsakul i sur., 2007.; Webster i Weber, 2007.).

2.1.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor, poznata i pod nazivima *Coriolus versicolor* i *Polyporus versicolor*, je gljiva bijelog truljenja iz razreda Basidiomycetes (**Slika 2.1.**). U prirodi se pojavljuje u više različitih boja, po čemu je i dobila ime (lat. *trametes* – mršav; *versicolor* – u više boja). Izgledom podsjeća na puranov rep pa je u SAD-u nazivaju Turkey Tail (Webster i Weber, 2007.).



(<http://www.homeopathiccareclinic.ca/apps/blog/show/41413268-turkey-tail-the-cure-straight-from-the-forest-by-anna-sienicka>, 11.10.2014.)

(<http://backtoubannature.blogspot.com/>, 11.10.2014.)

Slika 2.1. Primjeri različitog izgleda gljive *Trametes versicolor*

Raste na posjećenim trupcima hrasta i drugih stabala (Lorenzo i sur., 2001.), na stabljikama i otpalim granama drveća. Široko je rasprostranjena u prirodi, a razni sojevi ovog mikroorganizma koriste se u svrhu proizvodnje izvanstaničnih lignolitičkih enzima lignin peroksidaze, mangan peroksidaze, celulaze, avicelulaze i ponajviše lakaze (Tavares i sur., 2005.; Singh, 2006.; Desai i Nityanand, 2011.).

Lignolitički enzimi učinkovito razgrađuju lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, mješavinu polikloriranih bifenila i brojne sintetske boje, a proizvodnja enzima iz gljive bijelog truljenja može se stimulirati nedostatkom hranjivih tvari ili prisutnošću neke fenolne komponente u hranjivom mediju. Dodatak različitih induktora može dovesti do povećanja u proizvodnji lignolitičkih enzima (Gadd, 2001.; Xavier i sur., 2007.).

Trametes versicolor učinkovito provodi delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe i obezbojenje izlaznih tokova nastalih izbjeljivanjem pulpe. Stoga *Trametes versicolor* ima najveću primjenu u industriji pulpe i papira, čime se nastoji izbjeći upotreba organskih ili anorganskih kiselina i drugih kemikalija koje su štetne za okoliš (Young i Masood, 1998.).

2.1.2. Lakaze

Enzimi su proteini velike molekularne mase (prirodni polipeptidni lanci nastali spajanjem velikog broja aminokiselina peptidnim vezama). Nazivaju se biokatalizatorima zato što nastaju unutar živih stanica i kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu. Enzimi, kao katalizatori, ubrzavaju reakciju tako što snižavaju energiju aktivacije, a po završetku reakcije ostaju nepromijenjeni. Reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura, tlakova i ekstremni pH, tako da se u optimalnim uvjetima mogu katalizirati reakcije koje su najmanje 10^6 puta brže od reakcija koje se odvijaju bez prisustva enzima.

Enzimi su uglavnom selektivni katalizatori te se odnos enzim – supstrat može opisati mehanizmom ključ – brava. Aktivnost enzima ovisi o koncentraciji supstrata, pH, temperaturi te o drugim čimbenicima. Pri ekstremnim vrijednostima navedenih čimbenika dolazi do denaturacije proteina i gubitka aktivnosti enzima.

Enzimi se primjenjuju u brojnim industrijskim procesima, npr. u fermentaciji vina, proizvodnji kruha, sireva, piva, različitih kemijskih spojeva itd. Primjenjuju se u analitičke

svrhe, a u medicini su značajni jer uništavaju mikroorganizme koji uzrokuju bolesti, ubrzavaju zacjeljivanje rana (trombin) i pomažu u dijagnosticiranju različitih bolesti (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/479680/protein/72581/Other-functions>, 11.10.2014.).

Prema tipu reakcije koju kataliziraju dijele se na oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Osnovni lignolitički izvanstanični enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina su peroksidaze koje sadrže željezo: lignin peroksidaza (LiP) i mangan peroksidaza (MnP) te oksidaza lakaza. Sudjeluju u oksidacijskim reakcijama u kojima se razara složena aromatska struktura lignina u spojeve manje molekulske mase koji se tada mogu transportirati unutar stanice i dalje razgraditi (Gadd, 2001.).

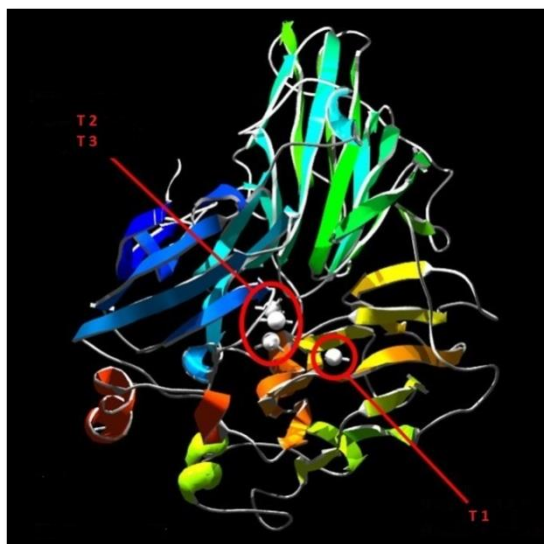
Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) su izvanstanični enzimi i zahvaljujući toj činjenici mogu se koristiti u industriji. Pripadaju grupi oksidoreduktaza, a s obzirom na porijeklo mogu se podijeliti na lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva. Lakaze porijeklom iz gljiva predstavljaju znatno rašireniju i zastupljeniju skupinu. Najveći broj ih je izoliran iz gljiva bijelog truljenja, učinkovitih razgrađivača lignina pa se može reći da su najvažniji enzimi koji sudjeluju u procesu razgradnje lignina (Riva, 2006.; Desai i Nityanand, 2011.). U novije vrijeme su izolirane i okarakterizirane lakaze iz bakterija i kukaca (Singh i sur., 2009.; Desai i Nityanand, 2011.).

Lakaza, kao plava oksidaza, je glikoprotein gdje ugljikohidratna masa čini 10 – 45 % mase enzima i uključuje ugljikohidrate poput heksozamina, glukoze, manoze, galaktoze, fruktoze i arabinoze (Yaropolov i sur., 1994.).

Poznato je da lakaze sudjeluju u procesu nastanka spora kod gljiva, u procesu nastajanja melanina, u procesu sklerotizacije kod kukaca, oksidaciji voća i povrća, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama te kataliziraju biorazgradnju lignina gdje uglavnom oksidiraju fenolne podjedinice lignina, a sudjeluju i u biosintezi lignina.

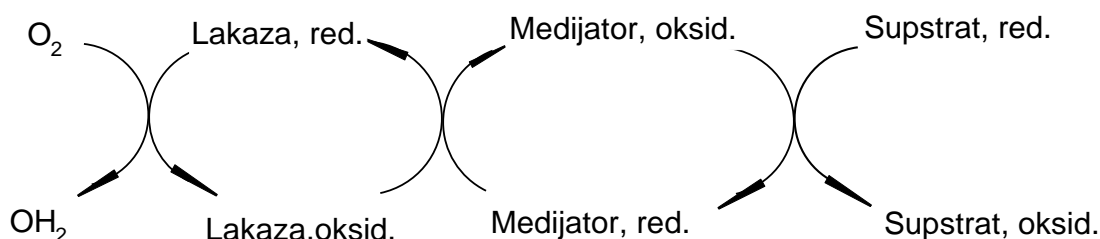
Lakaze pripadaju skupini metaloenzima i u svom katalitičkom centru sadrže više atoma bakra. Provode oksidaciju fenola i aromatskih amina pri čemu reduciraju molekularni kisik u vodu. Za katalitičku aktivnost lakaze iz gljiva potrebna su minimalno četiri atoma bakra po aktivnoj jedinici proteina, razmještena na tri funkcionalna mjesta (T1, T2 i T3). T1 mjesto sadrži jedan atom bakra, paramagnetski „plavi“ bakar koji apsorbira pri 610 nm,

zatim paramagnetski „ne plavi“ bakar (T2) koji ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra i dijamagnetski par bakar-bakar(T3) koji apsorbira pri 330 nm (**Slika 2.2.**). Različiti centri bakra prenose elektrone s reducirajućeg supstrata na molekulu kisika. Elektroni sa supstrata prelaze na bakar T1 te na klaster kojeg čine bakar T2 i T3, zatim slijedi redukcija kisika i nastanak vode (Couto i Toca-Herrera, 2007.; Minussi i sur., 2007.; Kunamneni i sur., 2008.; Singh, 2009.; Desai i Nityanand, 2011.).



Slika 2.2. Lakaza iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (Piontek i sur., 2002.)

Za razliku od većine enzima koji posjeduju specifično svojstvo samo prema određenom supstratu, lakaze djeluju na veliki broj različitih supstrata. Uz pomoć kisika kataliziraju oksidaciju *o*-, *p*-difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, nekih anorganskih iona, arildiamina, lignina, aromatskih amina, različitih nefenolnih supstrata te askorbinske kiseline. Za razgradnju nefenolnih spojeva i velikih spojeva poput lignina, lakaze trebaju pomoć nekih niskomolekularnih spojeva (medijatora) (**Slika 2.3.**) kao što su 3-hidroksiantranilat (HAA), 1-hidroksibenzotriazol (HBT) i 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Kunamneni i sur., 2008.; Janeš, 2009.; Majeau i sur., 2010.; Desai i Nityanand, 2011.).



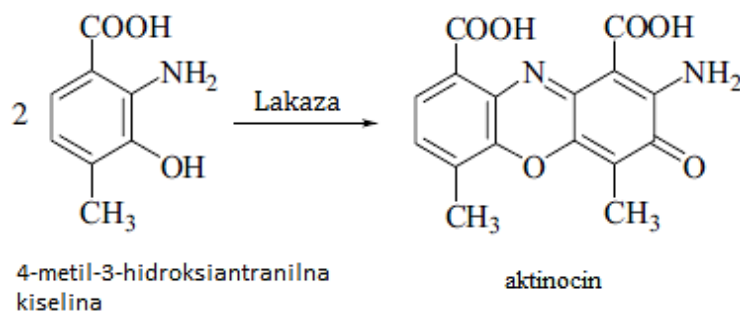
Slika 2.3. Katalitički ciklus lakaza – medijator oksidacijskog sustava (Kunamneni i sur., 2008.; Desai i Nityanand, 2011.; Tišma, 2008.)

Ekološka prihvatljivost i sposobnost kataliziranja širokog spektra reakcija čini lakaze dobrim biokatalizatorima za istraživanje, primjenu u bioremedijaciji, u prehrambenoj i drugim industrijama. Uspješna primjena u spomenutim procesima zahtijeva proizvodnju velikih količina lakaze, stoga, smanjenje troškova proizvodnje lakaze, optimizacijom uvjeta fermentacije u industrijskoj primjeni predstavlja jedno od temeljnih istraživanja (Couto i Toca-Herrera, 2007.).

Značajnu primjenu lakaze imaju u industriji pulpe i papira, u procesima izbjeljivanja pulpe, što je ekološki prihvatljivije rješenje u odnosu na primjenu kemikalija na bazi klora (Gadd, 2001.).

U prehrambenoj industriji lakaze se mogu upotrebljavati za sprječavanje promjena poput gubitka boje, mutnoće, promjene okusa i mirisa hrane i pića, odnosno u svrhu poboljšanja kvalitete (Minussi i sur., 2002.).

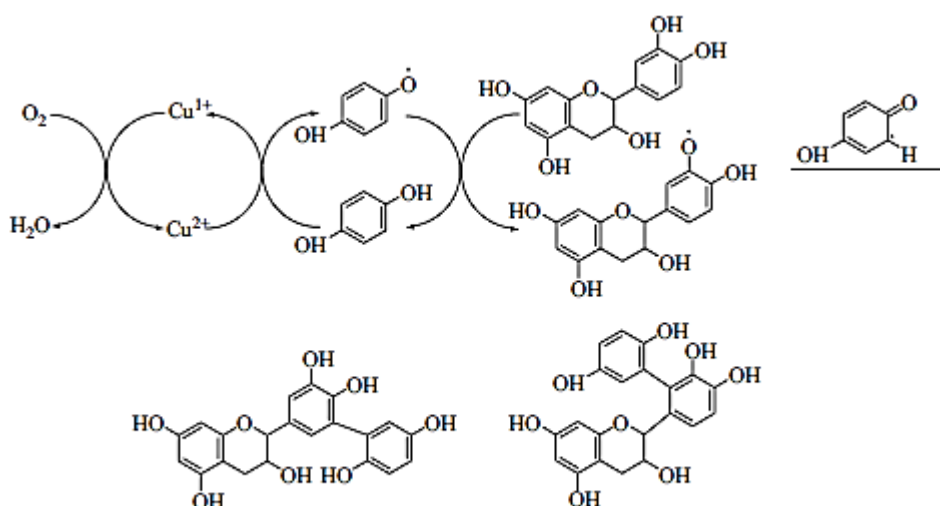
Imaju veliko značenje u farmaceutskoj industriji jer kataliziraju reakciju kojom iz 4-metil-3-hidroksiantranilne kiseline nastaje aktinocin (4,6-dimetilfenoksazinon-1,9-dikarboksilna kiselina) (**Slika 2.4.**) (Zavišek, 2005.), poznat po svojoj učinkovitosti u borbi protiv raka jer blokira transkripciju DNA tumorske stanice (Kunamneni i sur., 2008.; Osiadacz i sur., 1999.).



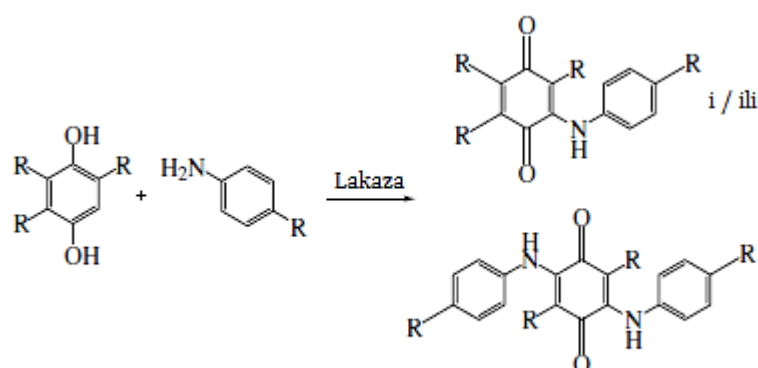
Slika 2.4. Reakcija sinteze aktinocina, katalizirana lakazom (Zavišek, 2005.)

Poznato je da se lakaze primjenjuju u enzimskim imunotestovima (EIA) te kao biosenzori za detekciju raznih fenolnih spojeva. Također mogu oksidirati katehine, molekule koje su kondenzirane strukturne jedinice tanina i smatraju se važnim antioksidansima te se nalaze u biljkama, povrću i čajevima. Sposobnost katehina da uklanjaju slobodne radikale čini ih važnima u sprječavanju karcinoma, upala i kardiovaskularnih bolesti. Oksidacija katehina katalizirana lakazom (**Slika 2.5.**) daje produkte (polifenole) visoke antioksidacijske sposobnosti (Kunamneni i sur., 2008.; Desai i Nityanand, 2011.).

U kozmetičkoj industriji mogu se primijeniti kao sastavni dio paste za zube, u svrhu pospješivanja izbjeljivanja zubi i u boji za kosu gdje smanjuju iritaciju kose i prihvatljivije su u odnosu na klasične boje koje sadrže vodikov peroksid kao oksidirajuće sredstvo (Desai i Nityanand, 2011.).



Slika 2.5. Produkti dobiveni reakcijom oksidacije(+)-katehina, kataliziranom lakazom uz medijator hidrokinon (Kunamneni i sur., 2008.)



Slika 2.6. Reakcija *p*-hidrokinona s primarnim aromatskim aminima pri čemu nastaju monoamin i/ili diamin kinon (Kunamneni i sur., 2008.)

2.2. Uzgoj mikroorganizama u obliku peleta

Dva osnovna načina uzgoja gljiva bijelog truljenja su:

- *solid-state* fermentacija (SSF)
- submerzna fermentacija (SmF)

Osnovna razlika između ove dvije tehnike je u količini slobodne tekućine prisutne u sustavu. SSF podrazumijeva rast mikroorganizama na čvrstim materijalima bez prisustva tekućine ili uz vrlo malu količinu tekućine, dok u submerznim uvjetima uzgoja mikroorganizmi rastu u tekućoj hranjivoj podlozi (Desai i Nityanand, 2011.).

Teško je napraviti usporedbu između ove dvije tehnike jer su to dva poprilično različita procesa. Studije o proizvodnji fungalnih enzima pokazale su da se *solid-state* fermentacijom, u usporedbi sa submerznom fermentacijom, postiže veća produktivnost, manja je sklonost problemima inhibicije supstratom, daje enzime stabilnije pri višim temperaturama i pH. Osim toga, vrijeme fermentacije je kraće i degradacija proizvedenih enzima nepoželjnim proteazama je minimalizirana (Desai i Nityanand, 2011.; Toca-Herrera i sur., 2007).

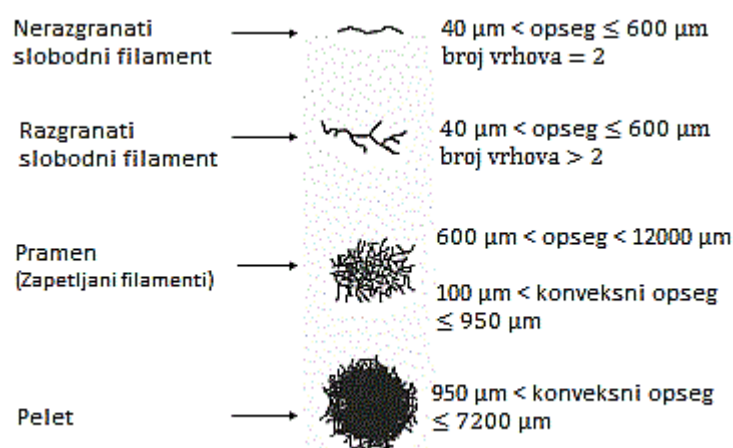
Unatoč brojnim prednostima, SSF se ne smatra boljom tehnologijom u odnosu na SmF, ponajviše zbog inženjerskih problema povezanih s prijenosom tvari i topline kao

posljedica heterogenosti sustava te poteškoćama pri uvećanju mjerila (*scale-up* procesa) (Xiong, 2004).

2.2.1. Submerzni uzgoj mikroorganizama

Uzgoj mikroorganizama u submerznim uvjetima podrazumijeva rast mikroorganizama u tekućoj hranjivoj podlozi pri čemu rast mikroorganizama ovisi o fizikalnim i kemijskim uvjetima. Optimalna temperatura, pH vrijednost i koncentracija hranjivih tvari važne su za rast biomase. Morfološke karakteristike micelijskih kultura uzgojenih u submerznim uvjetima predstavljaju jedan od ključnih bioprocesnih parametara. Tip morfologije i odgovarajuća fiziologija uvelike ovise o uvjetima u bioreaktoru te utječu na reološka svojstva smjese i učinkovitost bioreaktora. Prema tome, produktivnost i potrošnja energije tijekom procesa, funkcije su morfologije (Žnidaršič i Pavko, 2001.; Papagianni, 2004.).

Industrijski bioprocesi u kojima se koriste filamentozne gljive, obuhvaćaju proizvodnju većine komercijalno značajnih produkata biotehnologije, kako u količinskom smislu, tako i u smislu raznolikosti metabolita. To su uglavnom procesi submerznog uzgoja mikroorganizama, gdje postoji dinamičan odnos između uvjeta uzgoja i rasta pojedinih mikroorganizama. Posebni uvjeti uzgoja rezultiraju različitim fizikalno-kemijskim i morfološkim karakteristikama hifa. Na mikroskopskoj razini, mogu se razlikovati vlaknasti oblik rasta, kada su hife slobodno raspršene u hranjivoj podlozi te oblik peleta, kada se micelij razvija u obliku kuglastih nakupina koje se sastoje od zapletene mreže hifa. Također se mogu prepoznati i prijelazni oblici poput razvoja micelija u obliku flokula i granula, dok se pojam „pramen“ koristi za male, labave, raspršene nakupine micelija ili za velike i teške nakupine micelija (**Slika 2.7.**). Tip morfologije važan je za proizvodnju određenih metabolita i za potrošnju energije, a povezan je s adekvatnim miješanjem i aeracijom. Izvanredan napredak u metodama omogućio je karakterizaciju morfologije micelija gljive, što omogućava bolje razumijevanje i kontrolu bioprocesa. Za primjenu filamentoznih gljiva u industrijskim bioprocima neophodno je proučavati inženjerske aspekte poput miješanja, aeracije i dizajna reaktora u odnosu na rast, morfologiju i produktivnost mikroorganizma (Cui i sur., 1997.; Žnidaršič i Pavko, 2001.).



Slika 2.7. Morfološki tipovi rasta filamentozne gljive *Streptomyces olindensis* u submerznim uvjetima uzgoja (Pamboukian i sur., 2002.)

2.2.2. Mehanizmi rasta filamentoznih gljiva u submerznim uvjetima

Osnovna zajednička značajka filamentoznih mikroorganizama je njihov polarizirani rast u obliku filamenata odnosno niti, zvanih hife. Hifa raste iz jedne stanice – spore. Klijanjem glavne hife stvara se mreža hifa nazvana micelij. Životni ciklus filamentoznih gljiva započinje i završava u obliku spora. Dio spora koji će klijati i dinamika formiranja izduženih, cjevastih klica u submerznoj kulturi uglavnom ovise o stanju inokuluma i sastavu hranjive podloge. Mehanizmi koji reguliraju polarnost, smjer rasta i učestalost grananja hifa, određuju morfologiju micelija. Izlaganjem stresnim uvjetima, visoke sile smicanja mogu prevladati nad čvrstoćom hifa što rezultira fragmentacijom hifa. Fragmentacijom i grananjem hifa raste koncentracija biomase u submerznoj kulturi. Fragmentacija je funkcija sile smicanja pri čemu veliku važnost imaju struktura i dostupnost supstrata. Fleksibilnost hifa može varirati, ovisno o promjenama u sastavu stanične stijenke, načinu grananja i turgoru hranjive podloge. Rezultat povećanja osmotskog tlaka u hranjivoj podlozi je manji turgorski tlak, a time i fleksibilnije hife te smanjena viskoznost otopine. Sporulacija, kao krajnji razvojni ciklus gljiva, rijetko se postiže submerznim uzgojem, dijelom zbog relativno dobre dostupnosti hranjivih tvari, a dijelom i zbog fizikalne prirode stanične stijenke hifa. Aseksualna sporulacija nižih gljiva obično se javlja uslijed nedostatka hranjivih tvari. Istraživanja provedena u kemostatu su pokazala da je glavni pokretač sporulacije limitacija dušikom i da se uglavnom

odvija pri niskim specifičnim brzinama rasta. Limitacija prijenosa supstrata u unutrašnjost micelijskih nakupina također može rezultirati aseksualnom sporulacijom (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.2.3. Oblik i formiranje micelijskih peleta

Peleti se mogu klasificirati kao stabilne kuglaste ili ovalne nakupine koje se sastoje od razgranatih i isprepletenih mreža hifa. S ekonomskog gledišta, morfologija peleta u industrijskim procesima ima prednost u odnosu na filamentozni oblik rasta. Razlog tome su manja potrošnja energije uslijed prijenosa topline i tvari te mogućnost ponovne upotrebe biomase i kontinuirano odvijanje procesa. Osim toga, nastoje se izbjeći problemi poput tendencije rasta gljiva u obliku filamenata po stjenkama fermentora, oko rotora i na lopaticama miješala te začepljenje raspršivača zraka (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Micelijski peleti su vrlo neujednačene stanične nakupine kod kojih limitacija prijenosa topline i tvari uzrokuje biokemijske i strukturne promjene što rezultira nastankom različitih metaboličkih oblika. Veličina i oblik vanjske površine peleta variraju, pa tako peleti mogu biti pahuljastog, dlakavog do glatkog oblika. Za kvantitativni opis oblika peleta, uvedeni su omjer kružne jezgre baziran na omjeru između volumena peleta i guste jezgre peleta, što je 1 za kružne oblike, a više od 1 za ostale oblike. Peleti mogu biti labave ili čvrste strukture što određuje njihovu stabilnost na sile smicanja i transport tvari (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Razlikujemo koagulativne i ne-koagulativne formacije peleta. U prvom slučaju spore kglomeriraju u ranoj fazi razvoja, dok poslije peleti mogu nastati iz same spore. pH vrijednost hranjive podloge ima odlučujući utjecaj na koagulaciju spora, stoga se smatra da površinska svojstva spora ovise o pH. Osim toga, utvrđeno je da je velika brzina trešnje nepovoljna za formiranje koagulativnih peleta. Ako je inokulum u obliku raspršenih filamenata, tada se ne može razviti morfologija peleta (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Veličina i tip inokuluma, brzina trešnje, sastav hranjive podloge, temperatura te pH vrijednost glavni su faktori koji utječu na formiranje peleta, a za njihov uzgoj u submerznim uvjetima predložene su neke uobičajene tehnike poput niske koncentracije inokuluma, niska temperatura i hranjiva podloga s limitiranom koncentracijom dušika. Zbog brojnih faktora

koji utječu na rast i formiranje peleta, pokušaj dobivanja ujednačenih peleta, željene veličine, sastava i produktivnosti, još uvijek je predmet istraživanja za svaki pojedini soj mikroorganizama (Žnidaršič i sur., 1998.; Žnidaršič i Pavko, 2001.; Žmak 2006.).

2.2.4. Rast peleta

Peleti rastu na način da im se vanjski dio (površinski dio) povećava, s obzirom da je u središtu peleta nedovoljna koncentracija nutrijenata, zbog difuzije kao mehanizma prijenosa tvari, što izaziva lizu stanica. Tipični peleti sastoje se od tri regije. Rastuća regija vanjske ovojnice, ne-rastuća regija micelijske biomase i „šuplje“ središte. Morfologija biomase rezultat je različitog biokemijskog sastava stanica gljiva i njihovih staničnih stijenki (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Brojni matematički modeli koji se odnose na rast micelija u obliku peleta opisuju složene interakcije između rasta hifa i potrošnje supstrata, uključujući i problem ograničenja difuzije na makro razini. Dobro je poznata međusobna povezanost „trećeg korijena“ (eng. cube root) između ukupne biomase peleta i vremena uzgoja. Razvijen je matematički model za rast micelijskih peleta koji pruža nove centre rasta i predviđa učinak sila smicanja na rast peleta te distribuciju veličine. U jednostavnim morfološki strukturiranim modelima, vršne stanice, dovršne stanice i stanice hifa dijelovi su razgranatih elemenata hifa. Takvi modeli u kombinaciji s jednostavnim modelima opisuju rast mikroorganizama *Geotrichum candidum*, *Streptomyces hygroscopicus* i *Penicillium chrysogenum*. Modeli su prošireni s izrazima za klijanje spora, proširenje vrhova, grananje i razaranje hifa. Utvrđeno je da se brzina proširenja vrhova i učestalost grananja povećavaju s brzinom razrijeđenja u kemostatu koji radi u stacionarnom stanju. Navedeni modeli mogu se primijeniti u opisivanju rasta peleta na mikro razini (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Prilikom istraživanja mikroskopske morfologije koja obuhvaća ukupnu duljinu hifa i ukupan broj vrhova hifa te makroskopske morfologije koja obuhvaća oblik i veličinu micelijskih peleta tijekom uzgoja mikroorganizma *Aspergillus oryzae* pokazano je da je značajna količina biomase unutar peleta imala ograničen dotok kisika. Specifična brzina rasta prosječnog elementa hife odgovara specifičnoj brzini rasta mikrobne biomase u obliku

slobodnih elemenata hifa. Kako bi se opisao rast peleta, korišten je također zakon „trećeg korijena“ (Žnidaršič i Pavko, 2001.; Papagianni, 2004.).

2.2.5. Fragmentacija i raspad peleta

Intenzitet miješanja može oštetiti micelijske pelete, kao i određene hife. Fragmentacija dijelova hifa s vanjske površine peleta može rezultirati stvaranjem fragmenata hifa koji služe kao novi centri za rast biomase ili može doći do oštećenja hifa što je popraćeno oslobađanjem citoplazme. S druge strane, može doći do potpunog raspadanja peleta u slučaju nakupina koje su „šuplje“ u središtu. Fragmentacija i raspad peleta, uzrokovane silama smicanja, utječu na veličinu peleta i kvantitativni odnos između peleta i slobodnog micelija u kulturi. Osim toga, oblik peleta da li glatke i kompaktne ili pahuljaste, slobodne strukture, najviše ovisi o brzini gubitka energije. Radni uvjeti značajno utječu na veličinu peleta i njihovu strukturu te se tako peleti mogu razlikovati po svome polumjeru. Učinkoviti koeficijent difuzije varira, ovisno o gustoći peleta. Prijenos tvari konvekcijom je pojačan kroz vanjske rijetke dijelove peleta, a otežan je prijenos tvari u unutarnjim gustim regijama (Žnidaršič i Pavko, 2001.; Papagianni, 2004.).

2.2.6. Karakterizacija reoloških svojstava smjese

Brojni procesni parametri, kao što su inokulum, brzina rasta, sastav hranjive podloge, količina otopljenog kisika i intenzitet miješanja, utječu na morfologiju stanica te postepeno imaju velik utjecaj na reologiju smjese, što je ključno za uspješnost prijenosa topline i mase tijekom procesa fermentacije u bioreaktoru. Miješanje i aeracija, kojima se dovodi kisik mikroorganizmima i uklanja ugljikov dioksid tehladenje, kojim se odvodi metabolička toplina, imaju snažan utjecaj na produktivnost i efikasnost cjelokupnog procesa fermentacije (Žnidaršič i Pavko, 2001.; Papagianni, 2004.).

Otopine koje sadrže raspršene filamente uglavnom se ponašaju kao ne-njutnovske tekućine, vrlo visoke viskoznosti. Porastom brzine smicanja njihova viskoznost raste. *Power-law* i *Bingham-ov* model se najčešće koriste za opisivanje reoloških svojstava fermentacijske smjese. Ponekad, posebno kod niskih brzina smicanja, eksperimentalni podaci ne odgovaraju

niti *Power-law* niti *Bingham-ovom* modelu. U ovom slučaju može se primijeniti *Casson-ov* model (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Kada fermentacijska smjesa sadrži polimerne supstrate poput škroba, tijekom fermentacije viskoznost će opasti zbog enzimske razgradnje i potrošnje supstrata. Također može doći do promjene iz ne-njutnovskog u njutnovsko ponašanje. S druge strane, kada polimer nastaje tijekom fermentacije, porastom njegove koncentracije povećava se viskoznost smjese, u nekim slučajevima čak do 24 *Pas*. U raspoloživoj literaturi nije pronađen niti jedan reološki model koji bi opisao i objasnio ovaj kompleksni fenomen. Mjerenje reoloških svojstava fermentacije filamentoznih smjesa i interpretacija rezultata je stoga važno područje u biokemijskom inženjerstvu. Postoji nekoliko poteškoća u mjerenju s konvencionalnim uređajima za mjerenje reoloških svojstava kao što su koncentrični cilindar, stožasti, pločasti ili kapilarni viskozimetar. Nepoželjni fenomeni kao što su taloženje biomase, odvajanje faza na površini rotirajućeg cilindra, nehomogenost smjese u obliku peleta, trenje u suženim dijelovima cilindra i brzina klizanja uz cjevovod viskozimetra, često su uzrok neadekvatnih rezultata (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.2.7. Morfologija micelija i proizvodnja metabolita

Budući da tip morfologije utječe na reološka svojstva kultura koje su uzgojene u submerznim uvjetima te na prijenos topline i tvari, promjene u makromorfologiji također utječu na način prijenosa hranjivih tvari i metabolita unutar i izvan hifa tj. na mikroskopskoj razini. Rezultat je diferencijacija stanica u smislu biokemijske specijalizacije i strukturnih promjena. Rast filamentoznih mikroorganizama u obliku nakupina može uzrokovati aseksualnu sporulaciju, rijetko postignutu submerznim uzgojem gljiva, pri čemu dolazi do promjena u piknide ili do formiranja antrosporoidnih stanica. Ako uzmemo u obzir prijelaz iz primarnog u sekundarni metabolizam, kao posljedicu diferencijacije stanica, tada se može očekivati međusobna povezanost između tipa morfologije i proizvodnje metabolita (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Za formiranje nekih, osobito sekundarnih, metabolita potrebna je specifična morfologija. Preferira se rast u obliku peleta, a u industriji se primjenjuje za proizvodnju itakonske kiseline pomoću mikroorganizma *A. terreus*, limunske kiseline pomoću *A. niger* i za proizvodnju nekih fungalnih enzima poput celulitičkih enzima iz mikroorganizma

Trichoderma reesei, poligalakturonidaze iz *A. niger* ili α – galaktozidaze iz *M. vinaceae*, dok je filamentozni rast bolji za sintezu pektinskih enzima iz *A. niger* te za proizvodnju fumarne kiseline iz *R. arrhizus* (Žnidaršič i Pavko, 2001.; Žmak 2006.).

Alkaloidna sinteza je povezana s pojedinim fazama u životnom ciklusu gljiva: u prirodi, alkaloidi su sintetizirani u tijeku razvoja sklerocija, dok kod submerzno uzgojenih kultura, alkaloidna sinteza se nastavlja u morfološki i biokemijski sličnim stanicama u obliku sklerocija. Na diferencijaciju i alkaloidnu sintezu snažno utječu brzina prozračivanja i miješanja, definirajući međuodnos zrak / voda, koji definira unos kisika iz plinovite ili tekuće faze. Diferencijacija u produktivni rast u obliku sklerocija stimulirana je promjenom respiracije iz otopljenog kisika u plinoviti oblik, postignut povećanjem unosa zraka i primjenom veće koncentracije biomase u produkcijskoj fazi (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Osim odnosa između tipa morfologije i proizvodnje metabolita, istraživana je odnos između strukture i veličine peleta i njihove aktivnosti. Na osnovu toga zaključeno je da na proizvodnju izvanstaničnih enzima iz mikroorganizma *Trichoderma reesei* snažno utječe intenzitet miješanja, što rezultira različitim karakteristikama peleta. Istraživanja provedena na proizvodnji aflatoksina, sekundarnog metabolita *A. flavus* i *A. parasiticus*, uz opciju trešenja, pokazala su najveću proizvodnju toksina pri upotrebi čvrstih, glatkih peleta promjera 0,6 mm, zbog dodavanja nekih polimera ili korištenjem odgovarajućih koncentracija inokuluma (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Proizvodnjom β -fruktofuranozidaze pomoću mikroorganizma *A. japonicus*, u obliku peleta, najbolji rezultati postignuti su s pahuljastim, slobodnim peletima promjera manjeg od 3 mm, uz dodatak nekih polimera ili surfaktanata. Varijacije u proizvodnji enzima također mogu biti rezultat promjena fiziologije stanice i transporta tvari prilikom uzgoja uz prisutnost polimera ili surfaktanata. Dodavanjem različitih anorganskih soli, prijelaz filamentozne u peletnu morfologiju rezultira proizvodnjom različitih enzima, primjerice proizvodnja mangan peroksidaze iz mikroorganizma *Phanerochaete chrysosporium*, na koju utječe veličina peleta, uvjeti miješanja te koncentracija inokuluma pri čemu je najbolje koristiti pelete srednje veličine, odnosno promjera 2 – 3 mm (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

U studiji o uklanjanju teških metala iz vodenih otopina korišteni su peleti *Rhizopus oryzae*, različite veličine, pri čemu je optimalan promjer peleta bio važan za učinkovit proces biosorpcije. Proizvodnja fumarne kiseline pomoću istog mikroorganizma povezana je s

morfološkim promjenama na koje su utjecale različite pH vrijednosti hranjive podloge te koncentracija elemenata u tragovima. Najveća koncentracija fumarne kiseline postignuta je primjenom peleta promjera 1 – 1,5 mm (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

U studiji o istraživanju morfologije i proizvodnje enzima ksilanaze iz mikroorganizma *Aspergillus awamori*, u pilot postrojenju u reaktoru s miješalom te u *air-lift* bioreaktoru najveća produktivnost ksilanaze postignuta je u reaktoru s miješalom pri srednjoj brzini miješanja koja je iznosila 400 okr min⁻¹ (Siedenberg i sur., 1997.; Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.2.8. Dizajn bioprocesa s obzirom na morfološke karakteristike

Široki spektar bioprocesa ovisi o optimizaciji abiotskih faza i genetske strukture mikroorganizama te o njihovoj morfologiji i diferencijaciji. Shvaćanje kompleksnog odnosa između morfologije i svojstava bioreaktora osnova je za uspješan dizajn bioprocesa. S inženjerskog pogleda, najvažniji je utjecaj morfologije gljiva na reologiju kulture. Utjecaj uvjeta okoline na rast gljiva i morfologiju moraju se uzeti u obzir kod dizajniranja bioprocesa, npr. uvjeti miješanja i aeracije, način uzgoja i kinetika rasta, utjecaj temperature, brzina razrijeđenja te sastav hranjive podloge. Odabir odgovarajućeg tipa bioreaktora i dobar *scale – up* trebali bi osigurati rast odgovarajuće morfologije (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.3. Reološka svojstva fermentacijske smjese

Reologija fermentacijske smjese, koja se obično mijenja tijekom uzgoja, rezultat je vrlo kompleksnih interakcija između nekoliko parametara. Često je vrlo teško eksperimentalno proučavati utjecaj samo jednog od parametara, kao primjerice koncentraciju biomase, morfologiju stanice (uključujući veličinu, oblik i masu), površinsku strukturu stanice, fleksibilnost stanice i deformabilnost, brzinu miješanja, koncentraciju supstrata i koncentraciju polimernog produkta. Istraživanja utjecaja samo koncentracije biomase na reologiju smjese je zastarjelo i zbog gore navedene mogućnosti se ne primjenjuje. Predlaže se korelacija pri kojoj je viskoznost određene suspenzije proporcionalna udjelu suhe tvari biomase (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.3.1. Miješanje i aeracija

Miješanje je jedna od najvažnijih i neophodnih operacija koja se koristi u bioprocesima kako bi se postigla ujednačena koncentracija, temperatura i ostala svojstva sredine u kojoj se odvija fermentacija. Razdvajanje temeljne smjese u manje tekuće vrtloge u turbulentnim uvjetima obično se provodi pomoću miješala u bioreaktoru, s recirkulacijskom pumpom ili jednostavnije uvodeći zrak u reaktor pomoću različitih uređaja za prozračivanje. Miješanje uključuje miješanje hranjive podloge, raspršivanje zraka, održavanje suspenzije stanica, raspršivanje tekućine koja se ne može miješati te omogućavanje prijenosa topline. Interakcije između vrtloga tekućine i mikrobnih stanica mogu utjecati na morfologiju stanica ili čak uzrokovati mehanička oštećenja i fragmentaciju stanica te na reologiju smjese i formiranje produkta (Cui i sur., 1997.; Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Van Sujidim i Metz razvili su model kojim opisuju utjecaj brzine smicanja na mikromorfologiju gljiva. Otkriveno je da dužina glavne hife slobodnih filamentoznih micelija opada s porastom gubitka energije prilikom miješanja. Utjecaj miješanja i prozračivanja na makromorfologiju peleta je također intenzivno proučavan. Uvjeti miješanja i podvrgavanje stresu u bioreaktorima povezani su s tipom miješala i jako utječu na morfologiju mikroorganizama te kontroliraju reološka svojstva fermentacijske smjese. Utjecaj miješanja na morfologiju *Penicillium chrysogenum* (slobodnog, raspršenog oblika te u obliku čvrstih nakupina) ispitivan je koristeći radijalna, aksijalna te protustrujna miješala u laboratoriju, pilot postrojenju i u reaktorima različitih veličina (Žnidaršič i Pavko, 2001.).

Koncentracija kisika, kontrolirana miješanjem i uvjetima aeracije u različitim tipovima bioreaktora, utječe na tip morfologije. Specifična brzina rasta mikroorganizama ovisi o koncentraciji kisika i može utjecati na svojstva staničnog zida, duljinu hifa, hrapavost peleta te stoga i na viskoznost smjese. Niska brzina smicanja rezultira formiranjem raspršenih peleta većeg promjera, dok veća brzina smicanja dovodi do formiranja čvrstih, kuglastih peleta (Cui i sur., 1997.; Žnidaršič i Pavko, 2001.).

2.3.2. Utjecaj induktora na proizvodnju lakaze

Sastavni dio kompleksnih hranjivih podloga u submerznom uzgoju često su različiti induktori koji u velikoj mjeri pridonose produktivnosti enzima. Induktori mogu biti poljoprivrednog porijekla, primjerice kukuruzovina, sirak i slične žitarice, mekinje, piljevina, sjemenke i stabljike grožđa, kora banane te drugog voća i povrća. Primjena nekih od navedenih induktora je prikladna upravo zbog niskih troškova jer su nusproizvodi iz različitih industrija. Kao induktor često se upotrebljava otpad iz industrije pulpe i papira. Induktori mogu biti također sintetskog porijekla poput ferulične kiseline, pirogalola, veratrilnog alkohola, ksilidina, etanola, brojnih aromatskih spojeva, bakra te različitih smjesa fenolnih spojeva (Xavier i sur., 2007.; Nityanand, 2011.).

Sirak (*Sorghum vulgare*) je prosolika žitarica rasprostranjena širom svijeta. Zrno sirka služi kao stočna hrana, drvena drška i sirkova metlica za izradu metli, četki i sličnih proizvoda. Zrno sirka je po sastavu slično kukuruzu. Sadrži nešto više proteina (8 – 12%), a manje ulja te 72 – 76% škroba. Ukupno sadrži 24,77% šećera. Kemijski sastav sirka različit je u pojedinim fazama razvoja (**Tablica 1**) i različit je za svaku sortu (Malinar i sur., 1973.).

Tablica 1 Kemijski sastav sirka u pojedinim fazama razvoja

SORTA	FAZA RAZVOJA	SADRŽAJ HRANJIVIH TVARI (%)			EKSTRAKTIVNE TVARI BEZ DUŠIKA (%)	PEPEO (%)
		PROTEINI	ULJE	VLAKNA		
Domaći šećerni sirak	Početak metlanja	7,81	2,81	27,50	53,30	8,48
	Završetak	7,93	2,36	25,41	56,38	7,92
	Mliječna zrelost	6,25	1,60	22,91	64,10	5,14
	Voštana zrelost	6,56	2,01	19,47	64,83	6,13

3.EKSPERIMENTALNI DIO

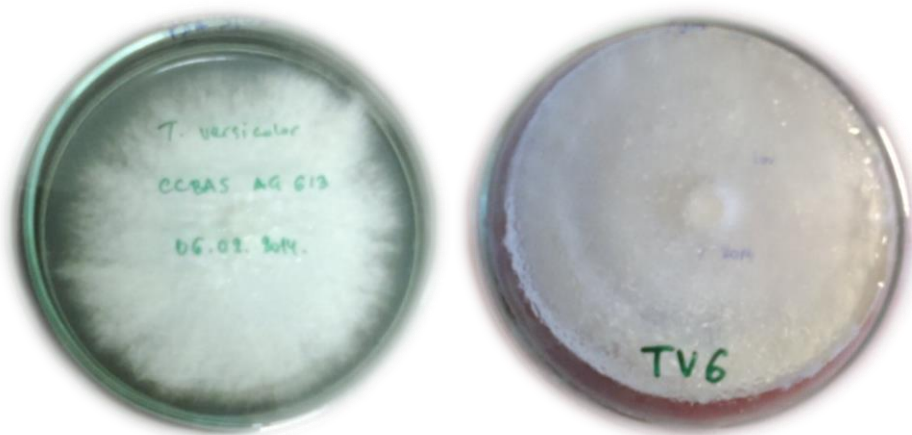
3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti proizvodnju enzima lakaze iz dva različita soja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja te istražiti utjecaj početne koncentracije biomase i dodatka sirka na aktivnost lakaze.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Mikroorganizam

U ovom radu korištena su dva soja mikroorganizma *Trametes versicolor*. *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija) i *Trametes versicolor* AG 613 (CCBAS, Prag, Češka Republika) (**Slika 3.1.**).



Slika 3.1. *Trametes versicolor* AG 613 i TV-6

3.2.2. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije: krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Njemačka), kvašćev ekstrakt (Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), pepton (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija), limunska kiselina monohidrat (E330) (AGZ d.o.o.), Calplex H90, elementi u tragovima ($0,035 \text{ g dm}^{-3}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $0,007 \text{ g dm}^{-3}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0,011 \text{ g dm}^{-3}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $0,002 \text{ g dm}^{-3}$ H_3BO_3 , $0,001 \text{ g dm}^{-3}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $0,00035 \text{ g dm}^{-3}$ KI), K_2HPO_4 , glukoza (Kemika Standard, Zagreb, Hrvatska), glicin (Acros Organics, New Jersey, USA), BSA otopina – goveđi serumski albumin.

3.2.3. Aparatura

Spektrofotometar

Koncentracija proteina određivana je na spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec) pri valnoj duljini 595 nm, a aktivnost lakaze pri valnoj duljini 420 nm.



Slika 3.2. Spektrofotometar

Tresilica

Submerzni uzgoj gljive *Trametes versicolor* i proizvodnja enzima provedeni su u Erlenmayerovim tikvicama pri temperaturi 27°C na tresilici (Julabo SW22) pri 120 okr min^{-1} .



Slika 3.3. Tresilica

Vertikalni laminarni kabinet

Vertikalni laminarni kabinet (Telstar AV100-CV100) je kabinet s vertikalnim laminarnim protokom gdje je provođen rad s mikroorganizmom i uzorcima kada je za to bilo potrebno sterilno okruženje u samom radnom prostoru.



Slika 3.4. Vertikalni laminarni kabinet

Autoklav

Sterilizacija korištenog laboratorijskog posuđa, pribora i potrebnih otopina provođena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) pri temperaturi 121 °C tijekom dvadeset minuta.



Slika 3.5. Autoklav

Centrifuga s hlađenjem

Nakon uzimanja uzoraka, prije daljnjeg analiziranja na spektrofotometru, uzorci su na *Multifuge 3 L-R* centrifugi (Heareus) centrifugirani pet minuta pri $13\,000\text{ okr min}^{-1}$.



Slika 3.6. *Multifuge 3 L-R* centrifuga s hlađenjem

pH-metar

Priprema otopina određenih pH vrijednosti u svrhu istraživanja ovisnosti aktivnosti enzima o pH provođeno je pomoću pH-metra (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter).



Slika 3.7. pH - metar

3.2.4. Uzgoj i čuvanje kulture

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija) i dodano je 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana te prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na

skrtnutu podlogu su potom naciepljeni mikroorganizmi u potezu. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.2.5. Priprema tekuće hranjive podloge za uzgoj inokuluma

Za pripremu hranjive podloge za uzgoj inokuluma pripremljena je otopina A koja je sadržavala 10 g dm⁻³ glukoze, 0,8 g dm⁻³ KH₂PO₄, 2 g dm⁻³ NH₄NO₃, 0,4 g dm⁻³ Na₂HPO₄, 0,5 g dm⁻³ MgSO₄ · 7 H₂O i 2 g dm⁻³ kvašćevog ekstrakta. Otopina je sterilizirana u autoklavu dvadeset minuta pri 121 °C. U svaku od šest Erlenmeyerovih tikvica volumena 300 mL dodano je 40 mL pripremljene i sterilizirane otopine A i 10 mL suspenzije spora, koncentracije 0,45 · 10⁶ spora/mL. Suspenzija spora pripremljena je homogeniziranjem pluga promjera 6 mm s krute hranjive podloge u 40 mL sterilizirane vode. Tikvice su zatvorene vatenim čepovima i ostavljene na tresilici pet dana, pri 27 °C i 120 okr min⁻¹. Nakon pet dana uzgojena kultura (**Slika 3.8.**) je profiltrirana na filter papiru i korištena u daljnjem radu.



Slika 3.8. Micelijski peleti *Trametes versicolor*

3.2.6. Priprema hranjive podloge za proizvodnju enzima

Za pripremu hranjive podloge za proizvodnju enzima (**Slika 3.9.**) pripremljena je otopina B koja je sadržavala 10 g dm⁻³ glukoze, 0,3 g dm⁻³ peptona, 0,5 g dm⁻³ kvašćevog ekstrakta, 0,8 g dm⁻³ KH₂PO₄, 0,2 g dm⁻³ Na₂HPO₄, 0,05 g dm⁻³ CaCl₂ · H₂O, 0,5 g dm⁻³ MgSO₄ · 7 H₂O, 0,25 g dm⁻³ limunske kiseline, 10 g dm⁻³ Calplex H90 i 10 mL elemenata u tragovima (0,035 g dm⁻³ FeSO₄ · 7 H₂O, 0,007 g dm⁻³ MnSO₄ · H₂O, 0,011 g dm⁻³

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $0,002 \text{ g dm}^{-3} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0,00035 \text{ g dm}^{-3} \text{ KI}$, $0,001 \text{ g dm}^{-3} \text{ CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$). Otopina je sterilizirana u autoklavu dvadeset minuta pri temperaturi od 121°C . U Erlenmeyerove tikvice volumena 300 mL dodano je 100 mL pripremljene i sterilizirane otopine B, odvagana je i dodana zadana količina inokuluma (4 g dm^{-3} , 5 g dm^{-3} i 25 g dm^{-3}), tikvice su zatvorene vatenim čepovima te stavljene u tresilicu pri 27°C i 120 okr min^{-1} .



Slika 3.9. Hranjiva podloga za proizvodnju enzima

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost lakaze mjerena je spektrofotometrijski pri $\lambda = 420 \text{ nm}$ i temperaturi 25°C u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 koristeći ABTS kao supstrat.

Otopina ABTS-a ($c = 3 \text{ mM}$) je pripremana otapanjem u glicin-HCl puferu ($\text{pH} = 3,5$) i čuvana je u tikvici obloženoj aluminijskom folijom, u hladnjaku pri 4°C .

Za analizu na spektrofotometru korišten je tekućinski ostatak nakon centrifugiranja. Uzorci su uzimani svaka 24 sata, nakon čega su centrifugirani 5 minuta pri $13\,000 \text{ okr min}^{-1}$.

Postupak mjerenja aktivnosti lakaze

Otopina ABTS-a je termostetirana minimalno pet minuta prije početka mjerenja pri 25°C . Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 , gdje je $100 \mu\text{L}$ uzorka dodavano u $500 \mu\text{L}$ otopine ABTS-a. Prije samog mjerenja sadržaj kivete je brzo ručno promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s , pri $\lambda = 420 \text{ nm}$, mjerena je promjena

apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) te je iz dobivenih promjena apsorbancije izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), d promjer kivete ($d = 1 \text{ cm}$), $\Delta A/\Delta t$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min^{-1}), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U dm^{-3}), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu volumne aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1 μmol supstrata u minuti (Tišma i sur., 2008.; Tišma, 2010.).

Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi:

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E}$$

gdje su $S.A.$ specifična aktivnost enzima (U mg^{-1}), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U dm^{-3}) i γ_E masena koncentracija enzima (mg dm^{-3}).



Slika 3.10. Obojenje nastalo oksidacijom ABTS-a lakazom

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja

kompleksa protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2013).

Izrada kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije proteina

Iz otopine BSA (goveđeg serumskog albumina) masene koncentracije 1 mg cm^{-3} pripremljene su otopine standardnog niza (niz otopina poznate koncentracije) volumena $100 \text{ }\mu\text{L}$ s koncentracijama od $0,1$ do $0,6 \text{ mg cm}^{-3}$, na način da je u kivete otpipetirano po $10 \text{ }\mu\text{L}$; $20 \text{ }\mu\text{L}$; $30 \text{ }\mu\text{L}$; $40 \text{ }\mu\text{L}$; $50 \text{ }\mu\text{L}$; $60 \text{ }\mu\text{L}$ otopine BSA te nadopunjeno destiliranom vodom do $100 \text{ }\mu\text{L}$.

U kivete sa $100 \text{ }\mu\text{L}$ standardnog niza dodano je 2 cm^3 Bradfordičinog reagensa i pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je očitana apsorbanacija pri valnoj duljini 595 nm. Na osnovi dobivenih rezultata izrađena je krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbanacije o koncentraciji BSA, tj. kalibracijska krivulja.

Postupak određivanja koncentracije proteina u uzorcima

U kivete je otpipetirano $100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka i dodano 2 cm^3 Bradfordičinog reagensa, svježe pripremljenog (razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 4). Tako pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je očitana apsorbanacija pri valnoj duljini 595 nm. Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti. Koncentracija proteina u uzorcima određena je u odnosu na kalibracijsku krivulju. Dobiveni rezultati su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti enzima.

3.3.3. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH

Aktivnost enzima ovisna je o pH otopine u kojem se odvija enzimska reakcija. Svaki enzim posjeduje optimalni pH pri kojem je najaktivniji, odnosno pri kojem postiže najvišu aktivnost, koja se smanjenjem ili povišenjem pH vrijednosti značajno smanjuje. Ispitivanje utjecaja pH na aktivnost enzima lakaze provedeno je u kvarcnim kivetama volumena 1 cm^3 . Mjerenja su provedena u $0,2 \text{ M}$ glicin-HCl puferu u rasponu pH od $2,4$ do $3,6$ te u $0,05 \text{ M}$ citrat-fosfatnom puferu u rasponu pH od $3,0$ do $5,4$ pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Iz dobivenih rezultata promjene apsorbanacije s vremenom, izračunata je volumna aktivnost (U dm^{-3}) te je izražena kao relativna aktivnost (%).

4.REZULTATI I RASPRAVA

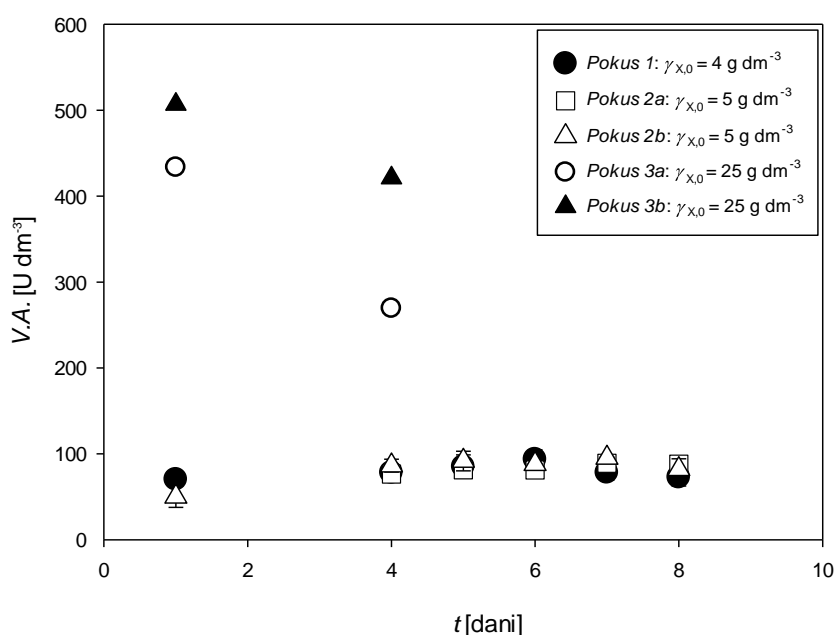
4.1.PROIZVODNJA ENZIMA

Proizvodnja enzima lakaze iz dva različita soja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (AG 613 i TV-6) provedena je šaržno u uvjetima submerznog uzgoja. Provedena su po tri pokusa s različitom početnom koncentracijom biomase za svaki soj gljive te dva pokusa sa sojem AG 613, s jednakom koncentracijom biomase i dodatkom različite koncentracije induktora s ciljem postizanja veće aktivnosti lakaze.

4.1.1. Utjecaj početne koncentracije biomase na proizvodnju lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6

Provedena su tri šaržna pokusa proizvodnje lakaze iz spomenute gljive u uvjetima submerznog uzgoja, u kojima je ispitan utjecaj različite početne koncentracije biomase. U svim pokusima, micelijski peleti su nakon proizvodnje profiltrirani i izvagani te je početna koncentracija biomase u pokusima proizvodnje enzima izražena kao masena koncentracija, $\gamma_{X,0}$ (g mokre biomase/ $V_{\text{hranjive podloge}}$). Pokusi su provedeni u dvije paralelne serije pri čemu je kod prvog pokusa u jednoj seriji došlo do kontaminacije pa je pokus zaustavljen.

U svim pokusima sastojci hranjive podloge i svi procesni parametri su bili jednaki ($T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120\text{ okr min}^{-1}$), osim početnih koncentracija biomase. U prvom pokusu početna koncentracija biomase bila je $\gamma_{X,0} = 4\text{ g dm}^{-3}$, u drugom pokusu $\gamma_{X,0} = 5\text{ g dm}^{-3}$, a u trećem pokusu $\gamma_{X,0} = 25\text{ g dm}^{-3}$. Volumne aktivnosti lakaze prikazane su na **Slici 4.1**.



Slika 4.1. Volumna aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama biomase ($T = 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)x,0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)x,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)x,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)

Pokusi su trajali osam dana tijekom kojih su uzorci iz tikvica analizirani svaka 24 sata. Uzorci su centrifugirani, a iz tekućinskog ostatka mjerena je aktivnost enzima prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1.**

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.1.**, vidljivo je da su najveće aktivnosti lakaze (507 U dm^{-3} i $433,67 \text{ U dm}^{-3}$) postignute u pokusima s najvećom početnom koncentracijom biomase ($\gamma_{x,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$) i to već nakon prvog dana trajanja pokusa, nakon čega aktivnost pada. Također je vidljivo da je u paralelnim pokusima došlo do određenog odstupanja u proizvodnji enzima. Tijekom šest dana trajanja pokusa s manjom početnom koncentracijom biomase vidljiv je porast aktivnosti lakaze nakon čega je aktivnost pala te su pokusi zaustavljeni. Sudar (2010.) je u pokusima proizvodnje lakaze iz mikroorganizma *Trametes versicolor* TV G-99, u uvjetima submerznog uzgoja, koristila početnu koncentraciju biomase $\gamma_{x,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, pri čemu je postignuta volumna aktivnost iznosila $617,15 \text{ U dm}^{-3}$ (Sudar, 2010.). Tako veća aktivnost lakaze najvjerojatnije je odraz povećane početne koncentracije biomase. U pokusu s početnom koncentracijom biomase $\gamma_{x,0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$ najveća volumna aktivnost postignuta je šesti dan uzgoja i iznosila je $101,42 \text{ U dm}^{-3}$, dok je u pokusu s

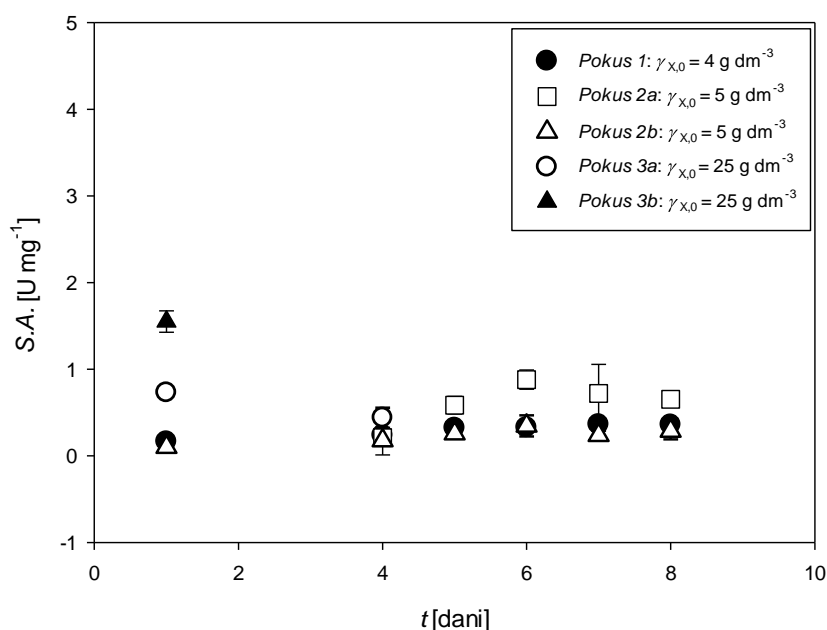
početnom koncentracijom biomase $\gamma_{X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$ najveća volumna aktivnost postignuta sedmi dan uzgoja i iznosila je $95,28 \text{ U dm}^{-3}$. Na temelju navedenih rezultata i na **Slici 4.1.** vidljivo je da je kod većih početnih koncentracija biomase volumna aktivnost lakaze peterostruko veća od aktivnosti lakaze kod niskih početnih koncentracija biomase.

Koncentracija proteina u uzorcima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6 određivana je prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.2.** Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 2** kao srednja vrijednost određivanja \pm standardna devijacija te su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti enzima prema već spomenutoj formuli (**Poglavlje 3.3.1.**).

Tablica 2 Koncentracija proteina u pokusima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6

POKUS	t [dani]	γ [mg cm ⁻³]
1 ($\gamma_{X,0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,431 \pm 0,0556$
	4	$0,331 \pm 0,0356$
	5	$0,265 \pm 0,0149$
	6	$0,288 \pm 0,0344$
	7	$0,221 \pm 0,0439$
	8	$0,209 \pm 0,0454$
2a ($\gamma_{X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$)	4	$0,660 \pm 0,6255$
	5	$0,142 \pm 0,0263$
	6	$0,093 \pm 0,0111$
	7	$0,141 \pm 0,0554$
	8	$0,135 \pm 0,0108$
2b ($\gamma_{X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,500 \pm 0,0340$
	4	$0,491 \pm 0,0094$
	5	$0,362 \pm 0,0491$
	6	$0,280 \pm 0,1094$
	7	$0,417 \pm 0,1050$
	8	$0,315 \pm 0,1288$
3a ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,595 \pm 0,0208$
	4	$0,641 \pm 0,1475$
3b ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,329 \pm 0,0253$

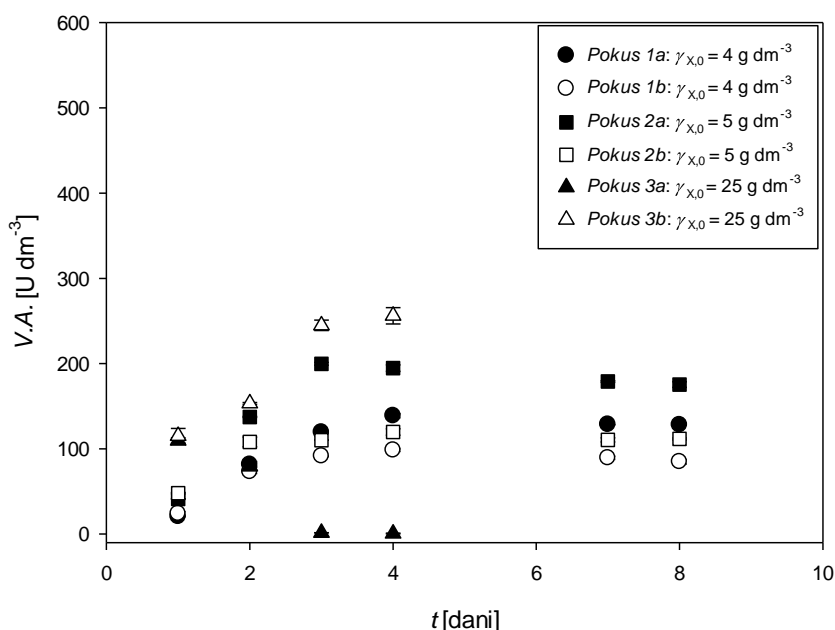
Slika 4.2. grafički prikazuje specifične aktivnosti lakaze. Kao i volumna aktivnost, najveća specifična aktivnost lakaze dobivena je u pokusima s većom početnom koncentracijom biomase ($\gamma = 25 \text{ g dm}^{-3}$), a iznosila je $1,55 \text{ U mg}^{-1}$.



Slika 4.2. Specifična aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama biomase ($T = 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)X,0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)

4.1.2. Utjecaj početne koncentracije biomase na proizvodnju lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613

Provedena su tri šaržna pokusa proizvodnje lakaze, u dvije paralelne serije, u uvjetima submerznog uzgoja gljive *Trametes versicolor* AG 613, kojima je ispitan utjecaj različite početne koncentracije biomase. U svim pokusima svi procesni parametri su bili jednaki kao kod proizvodnje lakaze iz gljive *Trametes versicolor* TV-6. Volumne aktivnosti lakaze prikazane su na **Slici 4.3**.



Slika 4.3. Volumna aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama biomase ($T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120\text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)X,0} = 4\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)X,0} = 5\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)X,0} = 25\text{ g dm}^{-3}$)

Pokusi su trajali osam dana tijekom kojih su uzorci analizirani svaka 24 sata. Uzorci su centrifugirani, a iz tekućinskog ostatka mjerena je aktivnost enzima prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1.**

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.3.**, vidljivo je da je najveća aktivnost lakaze dobivena u pokusu s najvećom početnom koncentracijom biomase ($\gamma_{X,0} = 25\text{ g dm}^{-3}$) pri čemu je u paralelnim pokusima došlo do odstupanja tijekom proizvodnje enzima. U prvoj seriji pokusa maksimalna aktivnost lakaze postignuta je nakon prvog dana uzgoja ($V.A. = 109,64\text{ U dm}^{-3}$), zatim je počela padati dok je u drugoj seriji pokusa s početnom koncentracijom biomase $\gamma_{X,0} = 25\text{ g dm}^{-3}$ aktivnost enzima postepeno rasla, a četvrti dan uzgoja dosegla je maksimalnu vrijednost od $256,04\text{ U dm}^{-3}$, što je manje u odnosu na proizvodnju lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6. U pokusima s manjom početnom koncentracijom biomase ($\gamma_{X,0} = 4\text{ g dm}^{-3}$), najveća aktivnost lakaze postignuta je šesti dan uzgoja i iznosila je $138,68\text{ U dm}^{-3}$, dok je u pokusima s početnom koncentracijom biomase $\gamma_{X,0} = 5\text{ g dm}^{-3}$ najveća aktivnost lakaze (200 U dm^{-3}) postignuta treći dan uzgoja.

Tablica 3 Koncentracija proteina u pokusima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor*

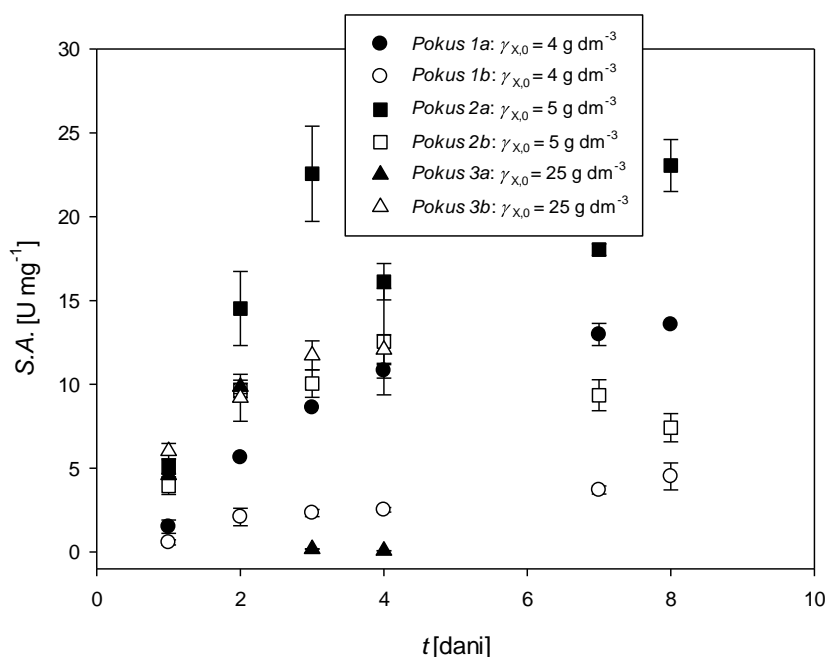
AG 613

POKUS	t [dani]	γ [mg cm ⁻³]
1a ($\gamma_{X,0} = 4$ g dm ⁻³)	1	0,009 ± 0,0016
	2	0,010 ± 0,0021
	3	0,010 ± 0,0044
	4	0,009 ± 0,0002
	7	0,010 ± 0,0005
	8	0,006 ± 0,0021
1b ($\gamma_{X,0} = 4$ g dm ⁻³)	1	0,028 ± 0,0051
	2	0,024 ± 0,0039
	3	0,026 ± 0,0016
	4	0,026 ± 0,0009
	7	0,024 ± 0,0015
	8	0,019 ± 0,0035
2a ($\gamma_{X,0} = 5$ g dm ⁻³)	1	0,008 ± 0,0007
	2	0,010 ± 0,0014
	3	0,009 ± 0,0011
	4	0,012 ± 0,0008
	7	0,010 ± 0,0002
	8	0,008 ± 0,0005
2b ($\gamma_{X,0} = 5$ g dm ⁻³)	1	0,012 ± 0,0017
	2	0,011 ± 0,0005
	3	0,011 ± 0,0009
	4	0,010 ± 0,0022
	7	0,012 ± 0,0012
	8	0,015 ± 0,0016
3a ($\gamma_{X,0} = 25$ g dm ⁻³)	1	0,024 ± 0,0005
	2	0,008 ± 0,0003
	3	0,008 ± 0,0006
	4	0,008 ± 0,0004
3b ($\gamma_{X,0} = 25$ g dm ⁻³)	1	0,019 ± 0,0015
	2	0,017 ± 0,0025
	3	0,021 ± 0,0016
	4	0,021 ± 0,0015

Tablica 3 prikazuje rezultate dobivene određivanjem koncentracije proteina u uzorcima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613, prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.2.** Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost određivanja ± standardna devijacija te su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti lakaze. U ovom slučaju koncentracije proteina su bile niže ($\gamma_{\text{proteina}} = 0,008 - 0,028$ mg cm⁻³) nego u eksperimentima

provedenim sa sojem *Trametes versicolor* TV-6 ($\gamma_{\text{proteina}} = 0,093 - 0,660 \text{ mg cm}^{-3}$). Tijekom trajanja procesa proizvodnje lakaze, s obzirom na izračunate koncentracije proteina, vidljivo je da nema linearnog porasta koncentracije proteina s porastom aktivnosti lakaze, što je rezultat činjenice da tijekom procesa dolazi do sinteze i drugih proteina, a ne samo lakaze.

Slika 4.4. grafički prikazuje specifične aktivnosti lakaze gdje je najveća specifična aktivnost lakaze dobivena u drugom pokusu s početnom koncentracijom biomase ($\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$), a iznosila je $23,06 \text{ U mg}^{-1}$.



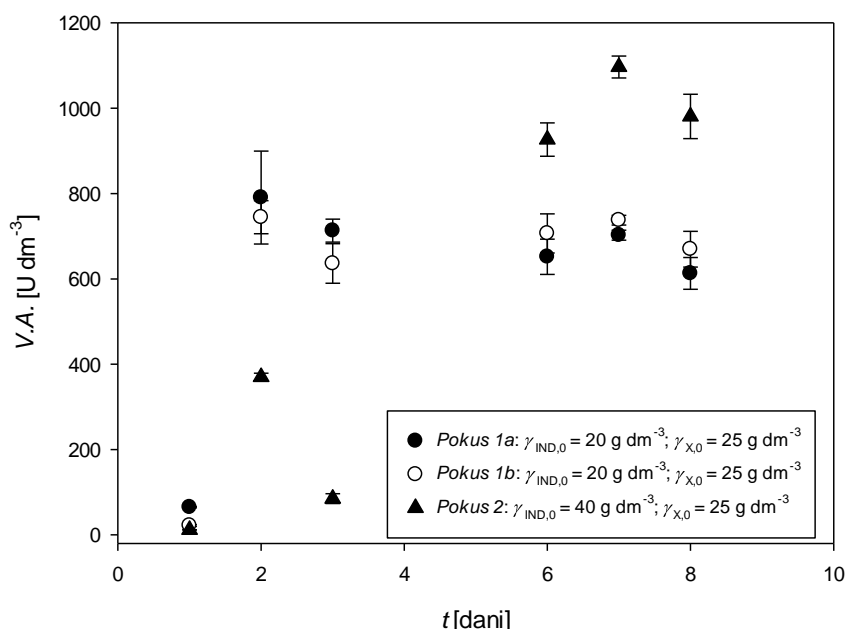
Slika 4.4. Specifična aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama biomase ($T = 27 \text{ °C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)X,0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)

4.1.3. Utjecaj dodatka sirka na proizvodnju lakaze iz gljive *Trametes versicolor* AG 613

Provedena su dva šaržna pokusa proizvodnje lakaze iz gljive *Trametes versicolor* AG 613 u uvjetima submerznog uzgoja, kojima je ispitan utjecaj početne koncentracije dodanog induktora (sirka) u hranjivu podlogu na proizvodnju lakaze.

Svi procesni parametri bili su jednaki u oba pokusa ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $T = 27 \text{ °C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$), osim početnih koncentracija sirka. Prvi pokus je proveden u dvije paralelne serije,

s početnom koncentracijom sirka $\gamma_{\text{IND},0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, dok je početna koncentracija sirka u drugom pokusu bila $\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$. Volumne aktivnosti lakaze u oba pokusa prikazane su na **Slici 4.5**.



Slika 4.5. Volumna aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama induktora ($T = 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)\text{X},0} = 4 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)\text{X},0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)\text{X},0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(1)\text{IND},0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$)

Pokusi su trajali osam dana tijekom kojih su uzorci iz tikvica analizirani svaka 24 sata na način kao u prethodnim eksperimentima.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.5**. vidljivo je da je aktivnost lakaze nakon drugog dana uzgoja porasla, ali je treći dan pala, nakon čega je opet počela rasti. Najveća volumna aktivnost postignuta je u pokusu s većom početnom koncentracijom induktora ($\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$), nakon sedam dana uzgoja, i iznosila je $1096,78 \text{ U dm}^{-3}$. U dva paralelna pokusa s manjom početnom koncentracijom induktora ($\gamma_{\text{IND},0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$) najveća volumna aktivnost postignuta je nakon drugog dana uzgoja te je u jednom pokusu iznosila $790,83 \text{ U dm}^{-3}$, a u drugom $744,78 \text{ U dm}^{-3}$.

Ovim istraživanjem proizvodnje enzima iz mikroorganizma *Trametes versicolor* AG 613, uz dodatak sirka, postignuta volumna aktivnost bila je četiri puta veća od postignute

volumne aktivnosti u pokusima bez dodatka sirka. Jedan od sastojaka hranjive podloge za proizvodnju enzima (**Poglavlje 3.2.6.**) bio je i Calplex H90 (otpad iz industrije papira), koji pospješuje proizvodnju lakaze. Dropulja (2010.) je u istraživanjima proizvodnje lakaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* G-99 kao induktor koristila dehidrirani otpad industrije papira početne koncentracije 20 g dm^{-3} i 3 g dm^{-3} inokuluma, pri čemu je maksimalna volumna aktivnost postignuta osmi dan uzgoja i iznosila je $2\,378 \text{ U dm}^{-3}$. Sudar (2010.) je u proizvodnji lakaze iz *Trametes versicolor* G-99 kao induktor također koristila otpad industrije papira početne koncentracije 60 g dm^{-3} i 30 g dm^{-3} inokuluma, ali u hranjivu podlogu nije dodavala pepton, pri čemu je maksimalna volumna aktivnost postignuta šesti dan uzgoja i iznosila je $1195,42 \text{ U dm}^{-3}$.

Kako u navedenim istraživanjima, tako i u istraživanjima u ovom diplomskom radu, veća početna koncentracija biomase te veća početna koncentracija induktora kao hranjivog supstrata pozitivno su utjecale na proizvodnju lakaze.

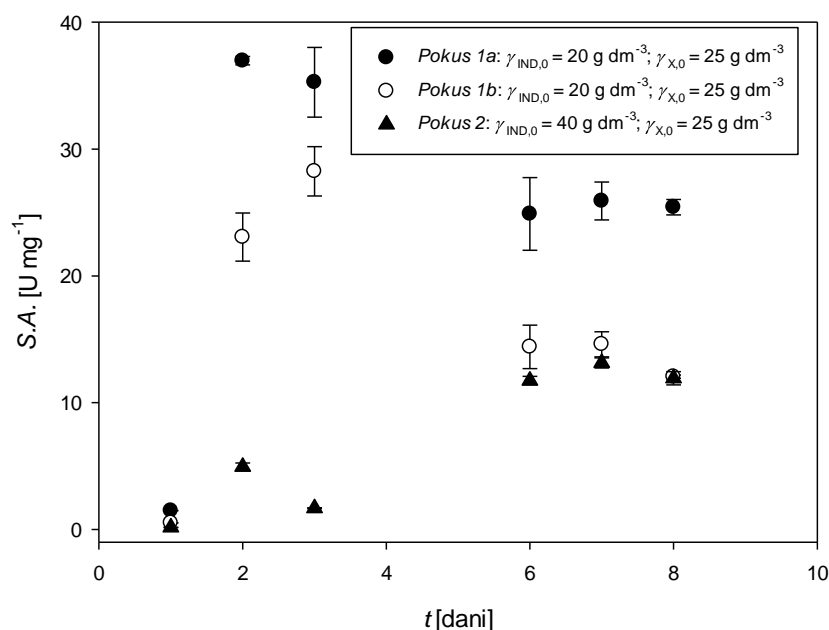
Rezultati dobiveni određivanjem koncentracije proteina u uzorcima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613 uz dodatak sirka prikazani su u **Tablici 4.** Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost određivanja \pm standardna devijacija te su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti enzima.

Tablica 4 Koncentracija proteina u pokusima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor*

AG 613 s dodatkom induktora

POKUS	t [dani]	γ [mg cm ⁻³]
1a ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,044 \pm 0,0002$
	2	$0,021 \pm 0,0002$
	3	$0,020 \pm 0,0015$
	6	$0,026 \pm 0,0029$
	7	$0,027 \pm 0,0016$
	8	$0,024 \pm 0,0006$
1b ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,042 \pm 0,0011$
	2	$0,032 \pm 0,0026$
	3	$0,023 \pm 0,0016$
	6	$0,050 \pm 0,0063$
	7	$0,051 \pm 0,0035$
	8	$0,056 \pm 0,0006$
2 ($\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$)	1	$0,072 \pm 0,0012$
	2	$0,075 \pm 0,0047$
	3	$0,050 \pm 0,0011$
	6	$0,079 \pm 0,0022$
	7	$0,084 \pm 0,0025$
	8	$0,082 \pm 0,0037$

Slika 4.6. grafički prikazuje specifične aktivnosti lakaze gdje je najveća specifična aktivnost lakaze dobivena u prvom pokusu, s početnom koncentracijom induktora $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, a iznosila je $36,96 \text{ U mg}^{-1}$.



Slika 4.6. Specifična aktivnost lakaze u pokusima s različitim početnim koncentracijama induktora ($T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 120\text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{(1)X,0} = 4\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)X,0} = 5\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(3)X,0} = 25\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(1)IND,0} = 20\text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{(2)IND,0} = 40\text{ g dm}^{-3}$)

U literaturi postoje brojna istraživanja koja se bave proizvodnjom lakaze iz različitih mikroorganizama, pri čemu su dodavani različiti induktori kako bi se postigla veća aktivnost lakaze. Lignocelulozni materijali uključuju širok raspon otpada iz poljoprivredne i drvne industrije, koji se uglavnom sastoji od polisaharida (celuloze i hemiceluloze) i lignina. Primjerice, Lorenzo i sur. (2001.) su kao induktore upotrebljavali sjemenke grožđa, stabljike grožđa i mekinje ječma koristeći *Trametes versicolor* (CBS100.29). Dodatkom mekinja postignuta je najviša aktivnost lakaze u rasponu od 500 do 600 U dm^{-3} , od 24. do 37. dana trajanja eksperimenta. U pokusu gdje su dodane stabljike grožđa postignuta je aktivnost od 300 do 400 U dm^{-3} , a u pokusu sa sjemenkama grožđa od 200 do 250 U dm^{-3} .

Na temelju rezultata istraživanja Tavares i sur. (2005.) dodatkom bakra kao induktora postignuta je aktivnost lakaze od 66 – 190 U dm^{-3} . Značajniji porast aktivnosti lakaze (do 5500 U dm^{-3}) postignut je pak kombinacijom bakra, ksilidina i mješavine fenolnih tvari.

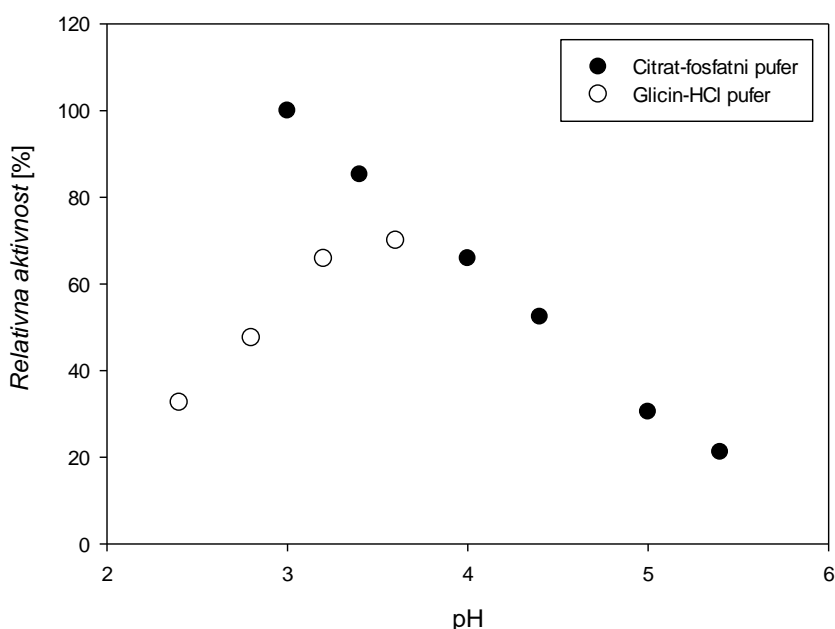
Optimizacija uvjeta uzgoja i sastava hranjive podloge važna je za proizvodnju lakaze, posebno za proizvodnju u velikom mjerilu. Primjenom Box-Behnken dizajna u proizvodnji lakaze iz gljive bijelog truljenja *Ganoderma* KU-Alk4, najbolji rezultati su postignuti koristeći

veratrilni alkohol kao induktor, pri čemu je aktivnost lakaze iznosila 240 U mL^{-1} , što je 12 puta veća vrijednost od postignute u eksperimentu provedenom u ne-optimiziranim uvjetima (20 U cm^{-3}) (Teerapatsakul i sur., 2007.).

Prema literaturnim podacima, osim spomenutih induktora, u proizvodnji lakaze iz različitih mikroorganizama korišteni su brojni drugi induktori poput piljevine bukve, otpada iz industrije piva, otpadne vode destilerija, kore banane, kore mandarine i dr. (Strong, 2011.; Ciber, 2013.).

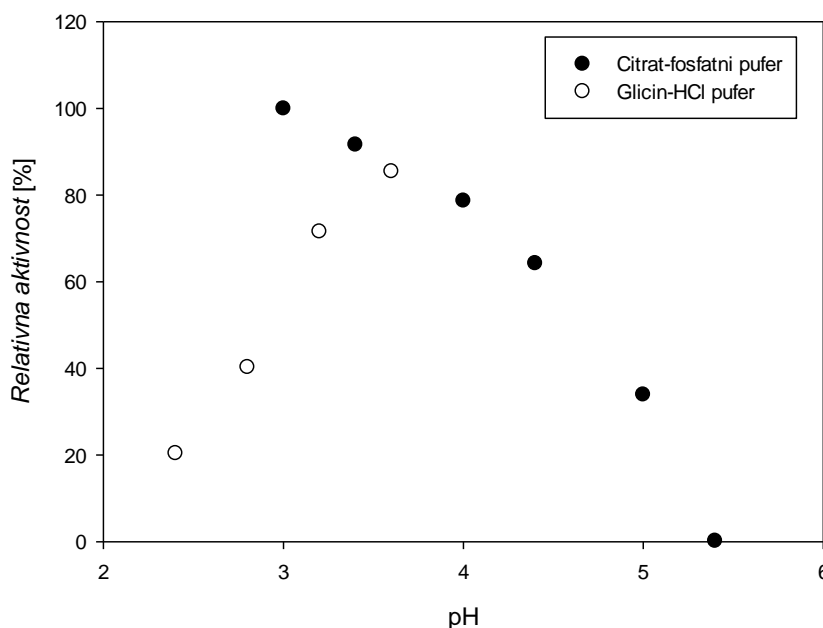
4.1.4. Ovisnost aktivnosti lakaze o pH

Pripremljene su otopine 0,1 M fosfatnog pufera (pH: 6,0 – 8,0), 0,05 M citrat-fosfatnog pufera (pH: 3,0 – 7,0) te 0,2 M glicin-HCl pufera (pH: 2,4 – 3,6). Mjerena je aktivnost lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6 i AG 613 koristeći ABTS otopljen u navedenim puferima, pri temperaturi 25 °C. U otopini fosfatnog pufera ABTS nije topljiv, a rezultati ovisnosti aktivnosti lakaze o pH vrijednosti u otopinama citrat-fosfatnog pufera i glicin-HCl pufera prikazani su na Slikama 4.7. i 4.8.



Slika 4.7. Ovisnost aktivnosti lakaze o pH, *Trametes versicolor* TV-6 ($T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\gamma_{x,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)

Maksimalna volumna aktivnost je izražena kao 100%-tna aktivnost te su u odnosu na nju izračunate ostale volumne aktivnosti i izražene kao relativne vrijednosti (%). **Slika 4.7.** grafički prikazuje ovisnost relativne aktivnosti lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6 ($V.A. = 263 \text{ U dm}^{-3}$) o pH u različitim puferima pri čemu je maksimalna aktivnost lakaze postignuta u citrat-fosfatnom puferu pri $\text{pH} = 3,0$, a u glicin-HCl puferu pri $\text{pH} = 3,6$.



Slika 4.8. Ovisnost aktivnosti lakaze o pH, *Trametes versicolor* AG 613 ($T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\gamma_{X,0} = 25 \text{ g dm}^{-3}$)

Slika 4.8. grafički prikazuje ovisnost relativne aktivnosti lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613 ($V.A. = 256 \text{ U dm}^{-3}$) o pH u različitim puferima pri čemu je maksimalna aktivnost lakaze također postignuta u citrat-fosfatnom puferu pri $\text{pH} = 3,0$, a u glicin-HCl puferu pri $\text{pH} = 3,6$.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka doneseni su sljedeći zaključci:

U ovom radu provedeni su pokusi uzgoja dva različita soja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613), u submerznim uvjetima, na tresilici te je dokazano da su oba soja proizvođači lakaze.

Dokazano je da na aktivnost lakaze utječu početna koncentracija micelijskih peleta i dodatak sirka.

U pokusima bez dodatka induktora koristeći soj *Trametes versicolor* TV-6 postignuta je maksimalna aktivnost lakaze 507 U dm^{-3} , dok je sa sojem *Trametes versicolor* AG 613 postignuta maksimalna aktivnost $256,04 \text{ U dm}^{-3}$. Maksimalne volumne aktivnosti su postignute kod oba soja *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613) u pokusima s početnom koncentracijom peleta 25 g dm^{-3} , što je bila maksimalna istraživana početna koncentracija peleta.

Istraživanjem utjecaja koncentracije sirka kao induktora na aktivnost lakaze u pokusu s *Trametes versicolor* AG 613, veća volumna aktivnost je postignuta pri višoj koncentraciji sirka (40 g dm^{-3}) i iznosila je $1096,78 \text{ U dm}^{-3}$ u odnosu na nižu koncentraciju sirka (20 g dm^{-3}) gdje je postignuta aktivnost $790,83 \text{ U dm}^{-3}$.

Dodatkom induktora u hranjivu podlogu za proizvodnju enzima aktivnost lakaze povećana je četiri puta.

Istraživanjem ovisnosti aktivnosti lakaze iz *Trametes versicolor* (TV-6 i AG 613) o pH u različitim puferima, maksimalna aktivnost lakaze postignuta je u citrat-fosfatnom puferu pri $\text{pH} = 3,0$.

6. LITERATURA

- Ciber J: Produkcija encimov glive *Trametes versicolor* na trdnem gojišču. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Ljubljana, 2013.
- Couto S R, Toca-Herrera J L: Laccases production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558 – 569, 2007.
- Cui Y Q, R G J M van der Lans, Luyben K C A M: Effect of Agitation Intensities of Fungal Morphology of Submerged Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 55: 715 – 726, 1997.
- Desai S S, Nityanand C.: Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98 – 124, 2011.
- Dropulja I: Oksidacija fenolnih spojeva katalizirana vlastito proizvedenom lakazom iz *Trametes versicolor*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Duraković S: Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Gadd G M: *Fungi in bioremediation*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2001.
- Haurowitz F: Protein. In *Encyclopædia Britannica, Inc.*: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/479680/protein/72581/Other-functions>, [11.10.2014.]
- Janeš K: Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
- Johnson J A: *Investigating fungi which cause rot and decay*, Tested studies for laboratory teaching, C.A. Goldman, 1990.
- Kunamneni A, Camarero S, Garcia-Burgos C, Plou F J, Ballesteros A, Alcalde M: Engineering and applications of fungal laccase for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7: 1475 – 2859, 2008.
- Lankinen P: Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus biosporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media. *Academic Dissertation in Microbiology*. University of Helsinki, Finland, 2004.
- Lorenzo M, Moldes D, Couto S R, Sanroman A: Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 82: 109 – 113, 2001.
- Majeau J-A, Brar S K, Tyagi R D: Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101: 2331 – 2350, 2010.
- Minussi C R, Miranda M A, Silva J A, Ferreira C V, Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore G M, Duran N: Purification, characterization and application of laccase from *Trametes*

- versicolor* for colour and phenolic removal off olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biotechnology* 6: 1248 – 1254, 2007.
- Minussi R C, Pastore G M, Duran N: Potential applications of laccase in the food industry, *Trends in Food Science & Technology* 13: 205 – 216, 2002.
- Nester E W, Anderson D G, Robert Evans Jr C, Pearsall N N, Nester M T: Microbiology – A Human Perspective. McGraw-Hill, 2004.
- Osiadacz J, Al-Adhami A J H, Bajraszewska D, Fischer P, Peczynska-Czoch W: On the Use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *Journal of Biotechnology*, 72: 141 – 149, 1999.
- Pamboukian C R D, Guimaraes L M, Facciotti M C R: Application of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 17 – 21, 2002.
- Papagianni M: Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22: 189 – 259, 2004.
- Pilaš J: Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T: Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological and Chemistry* 277: 37663 – 37669, 2002.
- Revankar M S, Lele S S: Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus *WR-1*. *Process Biocemistry* 41: 581-588, 2006.
- Riva S: Laccases, blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24, 219 – 226, 2006.
- Siedenberg D, Gerlach S R, Weigel B, Schugerl K, Giuseppin M L F, Hunik J: Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors: the influence of stirrer speed and phosphate concentration, *Journal of Biotechnology* 56, 103 – 114, 1997.
- Sienicka A: Turkey Tail? The cure straight from the forest, 2014. <http://www.homeopathiccareclinic.ca/apps/blog/show/41413268-turkey-tail-the-cure-straight-from-the-forest-by-anna-sienicka>, [11.10.2014.]
- Singh A, Kuhad R C, Ward O P: *Advances in Applied Bioremediation*. Springer, New York, 2009.
- Singh H: *Mycoremediation: fungal bioremediation*. Wiley-Interscience, New Jersey, 2006.
- Strelec I, Kovač T: *Praktikum iz biokemije*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.

- Strong P J: Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Enzyme Research*, Article ID 37916, 2011., doi:10.4061/2011/379176
- Sudar M: Matematičko modeliranje procesa rasta *Trametes versicolor* na različitim šećerima. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Tavares A M P, Coelho M A Z, Coutinho J A P, Xavier A M R B: Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 669 – 676, 2005.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Plazl I, Zelić B, Vasić-Rački Đ: Modelling of L-DOPA Oxidation Catalyzed by Laccase. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly* 22: 307 – 313, 2008.
- Tišma M: Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora. *Magistarski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
- Tišma M: Proizvodnja lakaze submerznim uzgojem *Trametes versicolor*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010.
- Toca-Herrera J L, Osma J F, Rodriguez Couto S: Potential of solid state fermentation for laccase production. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Mycobiology*, 391 – 400. Formatex, Bajadoz, Spain, 2007.
- Webster J, Weber R W S: Introduction to Fungi. *Cambridge University Press*, 2007.
- Wiedemer E: *Fungus Among Us! Part 1 – Medicinal Mushrooms*, 2013. <http://backtoubannature.blogspot.com/>, [11.10.2014.]
- Xavier A M R B, Tavares A P M, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 444 – 451, 2007.
- Xiong H: Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces Lanuginosus* Xylanases. *Dissertation*. Helsinki University of Technology, Helsinki 2004.
- Yaropolov A I, Skorobogat'ko O V, Vartanov S S, Varfolomeyev S D: Laccase: Properties, Catalytic Mechanism and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 94: 257 – 280, 1994.
- Young R A, Masood A: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.
- Zavišek K: Razvoj računalnih programa za automatsko pronalaženje novih sekvencija sintetaza poliketida i neribosomskih peptida. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2005.

- Žmak P M, Podgornik A, Podgornik H, Koloini T: Impact on pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1243 – 1249, 2006.
- Žnidaršič P, Komel R, Pavko A: Studies of a pelleted growth form of *Rhizopus nigricans* as a biocatalyst for progesterone 11 α -hydroxylation. *Journal of Biotechnology*. 60: 207 – 216, 1998.
- Žnidaršič P, Pavko A: The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology* 39: 237 – 252, 2001.
- Malinar A, Bićanić V, Bajer V, Rako B: Sirak. U *Poljoprivredna enciklopedija*. Jugoslovenski leksikografski zavod, Zagreb, 1973.